

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ & ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΔΙΚΑΡΒΟΞΙΜΙΔΙΚΩΝ
ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ ΣΕ ΣΤΑΦΥΛΙΑ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΝΕΑΣ
ΑΓΧΙΑΛΟΥ ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ**

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ Ι. ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΣ
(Α.Μ. 0493002)

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Υποβάλλεται στο Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής & Ζωϊκής Παραγωγής της
Σχολής Τεχνολογικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΒΟΛΟΣ ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 1998



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 32/2
Ημερ. Εισ.: 05-08-2003
Δωρεά: _____
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΓΦΖΠ
1998
ΑΘΑ



Εξεταστική επιτροπή:

Εισηγητής: Α.Χ. Παππάς, Καθηγητής Φυτοπαθολογίας

Μέλη: Ι.Α. Τσιτσιπής, Καθηγητής Εντομολογίας

Ν.Γ. Τσιρόπουλος, Λέκτορας Χημείας του Γενικού Τμήματος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
Ευχαριστίες	1
Πρόλογος	2
Περίληψη	3
A.) Βιβλιογραφική ανασκόπηση	
1 Φυτοπροστασία	4
1.1 Γενικά	4
1.2 Χημική φυτοπροστασία- Μυκητοκτόνα	5
1.3 Δικαρβοξυμικά- iprodione	10
1.4 Η Άμπελος και η προστασία της από το βοτρυτή	12
2 Υπολείμματα	19
2.1 Γενικά	19
2.2 Δειγματοληψία	24
2.3 Αποθήκευση	28
2.4 Επιλογή αναλυτικής μεθόδου	28
2.5 Αναλύσεις υπολειμμάτων	29
2.5.1 Προετοιμασία δείγματος	32
2.5.2 Εκχύλιση	36
2.5.3 Καθαρισμός	37
2.5.4 Συμπύκνωση	38
2.5.5 Προσδιορισμός	38
2.5.6 Εκτίμηση αποτελεσμάτων	39
2.6 Επίδραση των μεταποιητικών διαδικασιών στα υπολείμματα	40
2.7 Στοιχεία από τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τα υπολείμματα	46
B.) Πειραματικό μέρος	
1 Εισαγωγή	49
2 Υλικά και μέθοδοι	53
3 Αποτελέσματα	57
4 Συζήτηση-Συμπεράσματα	62
Βιβλιογραφία	65

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ τον Καθηγητή μου Αθανάσιο Παππά για την επίβλεψη, τις υποδείξεις και συμβουλές, καθώς και για την ενθάρρυνσή του για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Επίσης ευχαριστώ τον Δρ. Νικόλαο Τσιρόπουλο με την επίβλεψη και τη βοήθεια του οποίου έγινε το πειραματικό μέρος της εργασίας και η βιβλιογραφία για το μέρος αυτό.

Πρόλογος

Η εργασία που ακολουθεί έγινε στα πλαίσια των καθηκόντων μου σαν φοιτητή του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής και Ζωϊκής Παραγωγής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μεγάλο μέρος του υλικού για την βιβλιογραφική ανασκόπηση προέρχεται από τη βιβλιοθήκη του Εργαστηρίου Υπολειμμάτων Γεωργικών Φαρμάκων του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου στο οποίο απασχολήθηκα τον Ιούλιο του 1997 στα πλαίσια της πρακτικής μου εξάσκησης. Το πείραμα αγρού πραγματοποιήθηκε σε αμπελώνα της περιοχής Νέας Αγχιάλου του Νομού Μαγνησίας και οι αναλύσεις των υπολειμμάτων στο Εργαστήριο Χημικών και Βιολογικών Εφαρμογών του Γενικού Τμήματος και το Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής και Ζωϊκής Παραγωγής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Η εργασία χωρίζεται στη ανασκόπηση της βιβλιογραφίας και το πειραματικό μέρος. Στο πρώτο κεφάλαιο της βιβλιογραφικής ανασκόπησης ασχολήθηκα με τη χημική φυτοπροστασία με έμφαση στο θέμα των μυκητοκτόνων. Περισσότερα στοιχεία δόθηκαν για την ομάδα των δικαρβοξιμιδικών και κυρίως το *iprodione*, το οποίο χρησιμοποιείται για την προστασία της αμπέλου, μιας σημαντικής για τη Χώρα μας καλλιέργειας, από το βοτρυτή.

Στο δεύτερο κεφάλαιο αναλύω εκτενώς ένα σημαντικό πρόβλημα που συνεπάγεται η χρήση χημικών φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων, το πρόβλημα των υπολειμμάτων στα γεωργικά προϊόντα. Το μεγαλύτερο μέρος του κεφαλαίου αναφέρεται στις αναλύσεις υπολειμμάτων, κυρίως σε πειράματα αγρού. Επίσης αναφέρεται η επίδραση στα υπολείμματα των μεταποιητικών διαδικασιών, κάτι πολύ σημαντικό αφού πολλά γεωργικά προϊόντα καταναλώνονται μεταποιημένα. Τέλος δίνονται στοιχεία κανονισμών και αποτελέσματα αναλύσεων υπολειμμάτων στην Ευρωπαϊκή Ένωση.

Τα δεδομένα που παρουσιάζω για τα υπολείμματα αναφέρονται στην πλειοψηφία τους σε καρπούς και κυρίως σε σταφύλια. Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στα δεδομένα σχετικά με τα υπολείμματα δικαρβοξιμιδικών και άλλων μυκητοκτόνων στα σταφύλια και το κρασί, που είναι το θέμα του πειραματικού μέρους της πτυχιακής αυτής εργασίας.

Περίληψη

Το δικαρβοξιμιδικό μυκητοκτόνο iprodione εφαρμόστηκε σε αμπελώνα της Νέας Αγχιάλου Μαγνησίας για την προστασία των σταφυλιών από το βοτρυτή. Έγινε πείραμα αγρού με σκόπο τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων του iprodione στα σταφύλια σε διάφορες ημερομηνίες μετά τον τελευταίο ψεκασμό, μετά από δύο και τρεις εφαρμογές, με το εμπορικό σκεύασμα Rovral (iprodione 50% WP). Επίσης προσδιορίστηκαν τα υπολείμματα στον οίνο που προήλθε από τα παραπάνω σταφύλια.

Η ανάλυση έγινε με αέρια χρωματογραφία και ανιχνευτή NPD. Τα υπολείμματα στα σταφύλια 28 ημέρες μετά τον τελευταίο ψεκασμό, βρέθηκαν να είναι $2,7 \pm 0,30$ mg/kg και $4,0 \pm 0,43$ mg/kg στην περίπτωση που έγιναν δύο και τρεις ψεκασμοί αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων στους οίνους ήταν 1,8 mg/kg στην περίπτωση που έγιναν δύο εφαρμογές και 2,6 mg/kg στην περίπτωση των τριών εφαρμογών.

Οι παρατηρούμενες συγκεντρώσεις στα σταφύλια είναι χαμηλότερες από τα μέγιστο επιτρεπτό όριο υπολειμμάτων που έχει θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση για τα υπολείμματα στα σταφύλια το οποίο είναι 10 mg/kg. Για τους οίνους δεν έχει θεσπιστεί μέγιστο επιτρεπτό όριο υπολειμμάτων για το iprodione.

A.) Βιβλιογραφική ανασκόπηση

1. Φυτοπροστασία

1.1 Γενικά

Ένα σημαντικό ποσοστό της φυτικής γεωργικής παραγωγής, κάθε χρόνο, χάνεται λόγω της δράσεως των φυτοπαράσιτων. Η έννοια της λέξεως φυτοπαράσιτα στη φυτοπροστασία περιλαμβάνει όλους τους ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς που ζημιώνουν τη γεωργική παραγωγή, όπως έντομα, μύκητες, βακτήρια, ακάρεα, νηματώδεις σκώληκες, ιούς, ζιζάνια και φανερόγαμα παράσιτα, τρωκτικά, κ.α. Οι οργανισμοί αυτοί προκαλούν ζημιές είτε ολικές, δηλαδή καταστροφή του συνόλου της γεωργικής παραγωγής είτε μερικές, όπως είναι η απώλεια μέρους της παραγωγής ή η οικονομική υποβάθμισή της λόγω μη αποδοχής των προϊόντων από το καταναλωτικό κοινό και από τη βιομηχανία επεξεργασίας και μεταποίησης.

Υπάρχουν πολλά καταγεγραμμένα περιστατικά ολικής καταστροφής της γεωργικής παραγωγής στο πρόσφατο παρελθόν με σημαντικότερες κοινωνικοοικονομικές συνέπειες, τόσο για τις πληγείσες περιοχές, όσο και για το σύνολο της ανθρωπότητας. Ολικές καταστροφές καλλιεργειών είναι τα πιθανά αίτια για εξαφανίσεις πληθυσμών ή ακόμα και ολόκληρων πολιτισμών στο απώτερο παρελθόν, ενώ, ακόμα και σήμερα, ο κίνδυνος μιας ολικής καταστροφής είναι υπαρκτός με παράδειγμα τις επιδρομές ακρίδων σε χώρες της Αφρικής και της Μέσης Ανατολής, (Μπαλαγιάννης, 1985).

Σημαντικότερες είναι οι ζημιές λόγω μείωσης της ποσότητας και υποβάθμισης της ποιότητας των γεωργικών προϊόντων, χωρίς όμως να έχουν τα δυσάρεστα αποτελέσματα των ολικών καταστροφών, αφού συμβαίνουν συστηματικά. Έτσι οι απώλειες γεωργικών προϊόντων στις χώρες της Δυτικής Ευρώπης και της Βόρειας Αμερικής ανέρχονται στο 25% της ολικής γεωργικής παραγωγής.

Ο άνθρωπος προσπαθεί να διαφυλάξει και να χρησιμοποιήσει το μέγιστο δυνατό ποσοστό της γεωργικής παραγωγής και για το σκοπό αυτό λαμβάνει μέτρα για την προστασία της. Ο όρος προστασία της γεωργικής παραγωγής περιλαμβάνει κάθε σκόπιμη ενέργεια του ανθρώπου που έχει ως αποτέλεσμα την πρόληψη, ελάττωση

ή εκμηδένιση των ζημιών που προκαλούν τα διάφορα φυτοπαράσιτα. Τα κυριότερα από τα μέτρα που λαμβάνονται και τα μέσα που χρησιμοποιούνται είναι νομοθετικά, καλλιεργητικά, μηχανικά, οικολογικά, βιολογικά, και χημικά.

1.2 Χημική Φυτοπροστασία- Μυκητοκτόνα

Χημική φυτοπροστασία ονομάζουμε τη χρήση μιας μεγάλης σειράς χημικών ουσιών με σκοπό τη θανάτωση, παρεμπόδιση, ή απλώς επιβράδυνση της ανάπτυξης των φυτοπαρασίτων. Τα φυτοφάρμακα ή φυτοπροστατευτικά σκευάσματα είναι οικονομικά, αποτελεσματικά, και σε ορισμένες περιπτώσεις αποτελούν τη μόνη ικανοποιητική μέθοδο καταπολέμησης. Τα τελευταία χρόνια κατηγορούνται όλο και περισσότερο για πιθανές βλάβες στην υγεία των ανθρώπων και το περιβάλλον. Από το βιβλίο 'Silent Spring' της R. Carson μέχρι τα μέσα μαζικής ενημέρωσης και τις σελίδες του διαδυκτίου, τα φυτοφάρμακα έχουν γίνει στόχος πολλών επικρίσεων. Ο Ames, (1992), υποστηρίζει ότι υπάρχει πράγματι σχέση μεταξύ της χρήσης φυτοφαρμάκων και της υγείας των ανθρώπων. Η σχέση μεταξύ της χρήσης φυτοφαρμάκων και ασθενειών που προσβάλλουν τους ανθρώπους είναι σημαντική, ιδιαίτερα για αυτές που μεταδίδονται με έντομα. Το DDT, το πρώτο συνθετικό παρασιτοκτόνο, εξαφάνισε την ελονοσία από πολλά μέρη του κόσμου. Ήταν πολύ αποτελεσματικό εναντίον των φορέων της ασθένειας και πολλών παρασίτων των καλλιεργειών. Έτσι βοήθησε να αυξηθεί η παραγωγή και να μειωθεί το κόστος των προϊόντων κάνοντας τα έτσι προσιτά ακόμη και σε άτομα μικρών εισοδημάτων. Στην Κεϋλάνη, για παράδειγμα, σε λιγότερο από 20 χρόνια χρήσης του DDT, ο αριθμός των περιπτώσεων ελονοσίας μειώθηκε από 2.800.000 το χρόνο σε 17 μόνο (Ames, 1992). Όταν η χρήση του σταμάτησε, ο αριθμός αυξήθηκε πάλι. Δηλαδή κατηγορούνται ουσίες που βελτιώνουν την ζωή ή και τη σώζουν για βλάβες στην υγεία των καταναλωτών. Οι κάτοικοι των αναπτυγμένων χωρών βέβαια, δυσκολεύονται να καταλάβουν ένα τέτοιο επιχείρημα αφού δεν αντιμετωπίζουν πλέον τέτοια προβλήματα. Βεβαίως το DDT αποδείχθηκε επιβλαβές για το περιβάλλον και ιδιαίτερα για τα πουλιά λόγω βιοσυσσώρευσης. Το μόριό του είναι λιποδιαλυτό οπότε

συγκεντρώνεται στο λιπώδη ιστό των ζώων και πολύ σταθερό στο περιβάλλον, όπως όλων σχεδόν των οργανοχλωριωμένων γεωργικών φαρμάκων. Προβλήματα εμφανίστηκαν επίσης στα ψάρια και τα προϊόντα αυτών. Η Greenpeace δημοσίευσε μελέτη της, στην οποία φαίνεται ότι μουρουνέλαιο που πωλείται από καταστήματα ειδών υγιεινής διατροφής, περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις οργανοχλωριωμένων ουσιών, (<http://greenpeace.org/>). Όμως δεν είναι όλα τα φυτοφάρμακα σταθερά όσο τα οργανοχλωριωμένα στα οποία ανήκει το DDT.

Στη προσπάθειά μας να μειώσουμε τη χρήση χημικών μέσων καταπολέμησης δεν πρέπει να παραβλέπουμε ότι και οι άλλοι τρόποι καταπολέμησης μπορεί να μην είναι τελείως ακίνδυνοι. Τα φυτά δεν είναι απλώς τροφή για τον άνθρωπο και τα ζώα. Είναι οργανισμοί που παράγουν ουσίες απαραίτητες για την λειτουργία τους ή για να προστατευτούν από εχθρούς και ασθένειες, τα φυσικά παρασιτοκτόνα (natural pesticides). Οι ουσίες αυτές που περιέχουν τα φυτά μπορεί να είναι τόσο τοξικές για τον άνθρωπο, όσο και τα συνθετικά παρασιτοκτόνα ή και περισσότερο. Μέχρι τώρα έχουν ανακαλυφθεί συνολικά περίπου 10.000 τέτοιες ουσίες ενώ υπολογίζεται ότι κάθε φυτό παράγει μερικές δεκάδες, τα επίπεδα των οποίων πολλαπλασιάζονται αρκετά όταν το φυτό δεχθεί προσβολή από εχθρό, ασθένεια ή επίθεση από ζώο (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992). Υπολογίζεται ότι ο μέσος κάτοικος των ΗΠΑ παίρνει με τη τροφή του περίπου 1,5 g φυσικών παρασιτοκτόνων/ημέρα, ποσό το οποίο είναι 10.000 φορές περισσότερο από αυτό των συνθετικών (Ames, 1992).

Είναι εντυπωσιακό το ότι ελάχιστες από τις ουσίες αυτές έχουν ελεγχθεί για καρκινογένεση. Μεταξύ 1.502 χημικών ουσιών που έχουν ελεγχθεί, σε τουλάχιστον ένα είδος, για καρκινογένεση, μόνο 52 είναι ουσίες παραγόμενες από φυτά. Μεταξύ αυτών των 52, οι 27 είναι καρκινογόνες και περιέχονται σε επίπεδα πάνω από 10 ppm στα ακόλουθα προϊόντα: άνηθο, μήλα, λαχανάκια βρυξελλών, βασιλικό, λάχανο, καρότα, κουνουπίδι, κεράσια, καφέ, μελιτζάνα, σταφύλια, χυμό βοτρυοκάρπου και πορτοκαλιού, μέλι, ραδίκια, μαρούλι, μάνγκο, μανιτάρια, μαϊντανό, αχλάδια, μαύρο πιπέρι, δαμάσκηνα, πατάτες, σπόρο σουσαμιού, κ.α. (Ames, 1992). Οι 27 αυτές ουσίες περιέχονται και σε άλλα ευρέως καταναλισκόμενα προϊόντα σε επίπεδα μικρότερα από 10 ppm. Όμως τα φυτικά προϊόντα περιέχουν και άλλες πολύ χρησιμές

ουσίες όπως βιταμίνες, οι οποίες δρουν προστατευτικά για τον οργανισμό, ενώ για τις τοξίνες ο οργανισμός του ανθρώπου και των ζώων έχει αναπτύξει μηχανισμούς άμυνας. Υπάρχουν βεβαίως και φυσικά παραγόμενες τοξίνες, (μυκοτοξίνες), για τις οποίες δεν υπάρχουν μηχανισμοί άμυνας, και οι οποίες προκαλούν σοβαρά προβλήματα στην υγεία.

Συνήθως λέγεται ότι επειδή τα φυτά είναι μέρος της εξελικτικής ιστορίας του ανθρώπου, ενώ τα συνθετικά παρασιτοκτόνα είναι πρόσφατα, οι μηχανισμοί προστασίας που έχουν αναπτυχθεί δεν θα είναι αποτελεσματικοί για τα τελευταία. Αυτό δεν είναι απολύτως σωστό καθώς οι μηχανισμοί άμυνας που έχουν αναπτύξει τα ζώα είναι κυρίως γενικού τύπου, όπως θα ήταν αναμενόμενο, επειδή ο αριθμός και η ποικιλία των φυσικά παραγομένων ουσιών είναι πολύ μεγάλος. Γενικοί μηχανισμοί άμυνας προσφέρουν προστασία όχι μόνο από τις φυσικά παραγόμενες τοξικές ουσίες αλλά και από τις συνθετικές. Αυτό βέβαια δεν σημαίνει ότι επιτρέπεται η αύξηση του οποιουδήποτε κινδύνου με την αλόγιστη προσθήκη τεχνητά παρασκευασμένων ουσιών, σημαίνει απλώς ότι, μερικές φορές, ο κίνδυνος δεν είναι τόσο μεγάλος όσο φαίνεται ή όσο κάποιοι υποστηρίζουν.

Η πιο συνήθης εναλλακτική μέθοδος καταπολέμησης ασθενειών είναι η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών. Είναι αρκετά αποτελεσματική και για το λόγο αυτό τα χρηματικά ποσά που δαπανώνται παγκοσμίως για προστασία από ασθένειες είναι μικρότερα από ότι αυτά για την προστασία από ζιζάνια και έντομα (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992). Δεν μπορούμε όμως να πούμε ότι η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών είναι και αθώότερη της χημικής καταπολέμησης από τοξικολογική άποψη. Δεν έχουμε αρκετές πληροφορίες για να αποφανθούμε ότι οι φυτοαλεξίνες, ουσίες που παράγονται από τα φυτά και στις οποίες βασίζεται πολλές φορές η ανθεκτικότητα των φυτών, είναι πιο ακίνδυνες από μερικά μυκητοκτόνα. Αντίθετα υπάρχουν πρόσφατα παραδείγματα που τονίζουν τον τοξικολογικό κίνδυνο των ανθεκτικών ποικιλιών (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992). Πρέπει τέλος να σημειώσουμε ότι είναι λανθασμένη ακόμα και η άποψη ότι καρποί που παράγονται 'φυσικά', χωρίς τη χρήση χημικών μέσων δηλαδή, είναι καταλληλότεροι και ακίνδυνοι. Ο κίνδυνος προσβολής σε αυτές τις περιπτώσεις είναι μεγαλύτερος και κατά συνέπεια είναι μεγάλος και ο κίνδυνος ύπαρξης φυσικών τοξινών, που παράγονται είτε από τα

παθογόνα είτε από την αντίδραση του φυτού σε αυτά. Υπάρχουν, όπως προαναφέρθηκε, φυσικά παραγόμενες τοξίνες (μυκοτοξίνες) οι οποίες προκαλούν σοβαρά προβλήματα στην υγεία. Την πρώτη θέση στην κατηγορία αυτή κατέχουν οι αφλατοξίνες, προϊόν μεταβολισμού του μύκητα *Aspergillus flavus*. Από τις παλαιότερα γνωστές είναι η εργοτίνη, τοξίνη που παράγεται από το μύκητα *Claviceps purpurea* και που χαρακτηρίζεται από μεγάλη και οξεία τοξικότητα. Κατανάλωση σιτηρών με προσβολή από το μύκητα αυτό έχει προκαλέσει το θάνατο χιλιάδων ανθρώπων (Λέντζα-Ρίζου, 1983).

Τα συνθετικά παρασιτοκτόνα βοηθούν στην φυτοπροστασία αυξάνοντας την ποσότητα και βελτιώνοντας την ποιότητα των γεωργικών προϊόντων. Επίσης, υπάρχουν γεωργικά προϊόντα των οποίων η παραγωγή θα ήταν αδύνατη ή ασύμφορη χωρίς τη χρήση χημικών μέσων καταπολέμησης για μερικές καταστρεπτικές ασθένειες για τις οποίες δεν είναι διαθέσιμες ανθεκτικές ποικιλίες ή βιολογικά μέσα αντιμετώπισης.

Μυκητοκτόνα

Τα σκευάσματα που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των ασθενειών των φυτών που προκαλούνται από μύκητες ονομάζονται μυκητοκτόνα. Αν και αυτός ο όρος ετυμολογικά σημαίνει ότι το γεωργικό φάρμακο θανατώνει το μύκητα, χρησιμοποιείται και στην περίπτωση φάρμακων που απλώς παρεμποδίζουν ή επιβραδύνουν την ανάπτυξη των μυκήτων αντί του ορθότερου όρου μυκοστατικά. Διακρίνονται σε προστατευτικά, τα οποία προστατεύουν μόνο το μέρος του φυτού στο οποίο έχουν εναποτεθεί, και διασυστηματικά, τα οποία παραλαμβάνονται από το φυτό και μετακινούνται μέσα στο φυτικό σώμα. Τα προστατευτικά (όπως χαλκούχα, διθειοκαρβαμιδικά, φθαλιμίδια) είναι συνήθως μη εξειδικευμένοι παρεμποδιστές, με μεγάλο φάσμα δράσης κατά διαφόρων ασθενειών και η χρήση τους εξακολουθεί να γίνεται σε μεγάλη κλίμακα γιατί οι μύκητες δεν έχουν κατορθώσει να αναπτύξουν ανθεκτικότητα. Αντίθετα τα διασυστηματικά έχουν περισσότερο εκλεκτική τοξικότητα (selective toxicity) και μικρότερο φάσμα δράσης. Ένα πραγματικά

διασυστηματικό μυκητοκτόνο πρέπει να κυκλοφορεί στο εσωτερικό όλων των ιστών του φυτού και να μεταφέρεται και προς τα πάνω (αποπλαστική κίνηση) και προς τα κάτω (συμπλαστική κίνηση). Η συμπλαστική κίνηση γίνεται μέσω του πρωτοπλάσματος, είναι δηλαδή περίπτωση ενεργούς μεταφοράς, ενώ η αποπλαστική κίνηση γίνεται με μαζική ροή νερού και ουσιών μέσα από μη ζώντες ιστούς του φυτού όπως τα ξυλώδη αγγεία ή από τον ελεύθερο χώρο μεταξύ των πρωτοπλαστών, και εξαρτάται από τη διαφορά δυναμικού του νερού. Οι ουσίες που μπορούν να κινηθούν συμπλαστικά είναι πολύ λιγότερες από αυτές που κινούνται αποπλαστικά. Τα μυκητοκτόνα που διαθέτουμε σήμερα και τα ονομάζουμε διασυστηματικά, έχουν την ικανότητα για αποπλαστική μόνο κίνηση, δεν είναι δηλαδή στην κυριολεξία διασυστηματικά. Για ελάχιστα υποστηρίζεται ότι έχουν συμπλαστική κίνηση. Όπως είναι φυσικό, όργανα με μικρή διαπνοή όπως οι καρποί, δέχονται πολύ μικρή ποσότητα μιας αποπλαστικά κινούμενης ένωσης. Η παρασκευή νέων μυκητοκτόνων με το χαρακτηριστικό της συμπλαστικής κίνησης θα αυξήσει πολύ περισσότερο τις δυνατότητες της χημικής καταπολέμησης των μυκητολογικών ασθενειών (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

Τα φάρμακα μικρής εκλεκτικότητας έχουν κατά κανόνα μικρή αποτελεσματικότητα αφού ο αριθμός των μορίων φάρμακου που απαιτούνται για πρόκληση τοξικότητας σε ένα συγκεκριμένο ποσόν πρωτοπλάσματος είναι αντιστρόφως ανάλογος του βαθμού εκλεκτικότητας της ενώσεως. Για παράδειγμα, ενώ απαιτούνται 500 γρ/στρ. από το μη εκλεκτικό maneb για το φουζικλάδιο της μηλιάς, για τα εκλεκτικά benomyl και fenarimol οι δόσεις είναι 25 γρ./στρ. και 6,5 γρ./στρ. αντίστοιχα (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992). Αυτό βέβαια συνεπάγεται ευκολότερη απώλεια της αποτελεσματικότητας των εξειδικευμένων μυκητοκτόνων λόγω επικράτησης ανθεκτικών στελεχών των μυκήτων. Η επικράτηση ανθεκτικών στελεχών του *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά (benomyl, carbendazim), έδωσε την κατάλληλη ευκαιρία σε μια άλλη ομάδα μυκητοκτόνων, τα δικαρβοξιμιδικά, να κερδίσουν μια σημαντική θέση στην αγορά.

1.3 Δικαρβοξιμιδικά- iprodione

Δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα

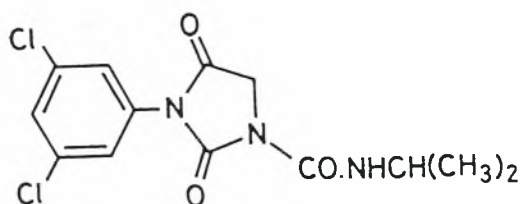
Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας του βοτρύτη στα βενζιμιδαζολικά έδωσε την ώθηση για την ανάπτυξη των δικαρβοξιμιδικών iprodione, procymidone, vinclozolin και chlozolate. Όλα έχουν μικρή διαλυτότητα στο νερό και είναι σταθερά σε ουδέτερα και ελαφρώς όξινα διαλύματα. Τα procymidone και chlozolate έχουν αποπλάστική διασυστημική δράση, ενώ τα iprodione και vinclozolin αναφέρονται ως μυκητοκτόνα επιφανείας με προστατευτική δράση. Το iprodione όμως, εφαρμοζόμενο στο έδαφος έχει και διασυστηματική δράση (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 1991β).

Τα δικαρβοξιμιδικά χρησιμοποιούνται ευρέως για την καταπολέμηση του βοτρύτη στην άμπελο και υπάρχουν ανησυχίες για την ύπαρξη υπολειμμάτων δραστικών ουσιών και μεταβολιτών αυτών στο κρασί. Η ταχύτητα υδρολύσεώς τους εξαρτάται από το pH του κρασιού και είναι μεγαλύτερη σε pH 4 παρα σε pH 3. Επίσης εξαρτάται από τη δραστική ουσία. Έχουμε μείωση της ταχύτητας υδρολύσεως κατά τη σειρά: chlozolate > vinclozolin > procymidone > iprodione (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 1991β).

Όλα τα δικαρβοξιμιδικά δρούν αναστέλοντας κυρίως την ανάπτυξη του μυκηλίου και δευτερευόντως παρεμποδίζουν τη βλάστηση των σπορίων των μυκήτων. Αναφέρεται ότι αναστέλουν τη σύνθεση της χιτίνης, αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από εκείνες που απαιτούνται για να επέλθει αναστολή στην ανάπτυξη μυκηλίων και τη βλάστηση σπορίων (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 1991β). Μια τελευταία θεωρία είναι ότι προκαλούν υπεροξειδωση των λιπιδίων, κυρίως στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, στην πυρινική μεμβράνη και στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ευαίσθητων μυκήτων (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992). Πάντως δεν αναφέρεται κοινό σημείο δράσεως όλων των δικαρβοξιμιδικών.

Iprodione

Μία από τις δραστικές ουσίες που ανήκουν στα δικαρβοξιμιδικά είναι αυτή με το κοινό όνομα iprodione. Το χημικό της όνομα είναι 3-(3,5-dichlorophenyl)-*N*-isopropyl-imidazolidine-2,4dione-dicarboxamide, ο χημικός της τύπος $C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$, ενώ ο συντακτικός τύπος δίνεται παρακάτω:



Η καθαρή μορφή του iprodione είναι άχρωμοι, άοσμοι και μη υγροσκοπικοί κρύσταλλοι με σημείο τήξης τους 136°C . Είναι ελάχιστα διαλυτό στο νερό, (13 mg/l στους 20°C). Η σταθερότητά του εξαρτάται από τις συνθήκες. Το iprodione διασπάται από την υπεριώδη ακτινοβολία ειδικά σε διαλύματά του στο νερό. Επίσης βρέθηκε ότι σε αλκαλικό περιβάλλον έχει μικρή σταθερότητα και σχηματίζει το ισομερές I, που είναι πολύ λιγότερο τοξικό για την ανάπτυξη του *Botrytis cinerea* σε σχέση με το αρχικό μόριο του iprodione (Cooke et.al., 1979).

Στο έδαφος αποδομείται με τελικό προϊόν το CO_2 και ο χρόνος ημιζωής του είναι 20-160 ημέρες (Μπαλαγιάννης, 1994). Η Παπαδοπούλου-Μουρκίδου (1991β) αναφέρει ότι η ταχύτητα καταβολισμού του iprodione στο έδαφος είναι αυξημένη σε όξινα εδάφη (pH 4,3-5,7) παρά σε αυτά με pH 6,5. Επίσης η ταχύτητα καταβολισμού αυξάνει μετά από κάθε εφαρμογή λόγω αύξησης του αριθμού των μικροοργανισμών που εμπλέκονται στην βιολογική διάσπασή του στο έδαφος. Η ημιπερίοδος ζωής του μειώθηκε από 30 σε 12 και 4 ημέρες μετά από την πρώτη, δεύτερη και τρίτη εφαρμογή αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό εξηγεί τη μείωση της αποτελεσματικότητάς του, εναντίων φυτοπαθογόνων μυκήτων όπως του *Sclerotium cepivorum* που προκαλεί λευκή σήψη στα κρεμμύδια.

Είναι μυκητοκτόνο επαφής με βιοχημικό τρόπο δράσεως την παρεμπόδιση της σύνθεσης στερολών και DNA αλλά κυρίως της μιτωτικής διαίρεσης. Εμποδίζει την

ανάπτυξη του μυκηλίου και τη βλάστηση των σπορίων. Δεν αποροφάται, πρακτικά, από τα φύλλα, αλλά μόνο από τις ρίζες και χρησιμοποιείται επίσης για επένδυση ‘σπόρου’ πατάτας. Είναι αποτελεσματικό για τα γένη: *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Monilinia*, *Alternaria*, *Sclerotium*, *Phoma*, και *Rhizoctonia*. Ο Pappas αναφέρει ανάπτυξη ανθεκτικότητας του βοτρύτη τόσο στο iprodione όσο και στα procymidone και vinclozolin (Pappas et.al., 1979). Οι δόσεις εφαρμογής του για ψεκασμούς στο αμπέλι είναι 50-100 γρ. σε 100 lt. νερό για κάθε στρέμμα και η τελευταία επέμβαση πριν τη συγκομιδή είναι 28 ημέρες.

Η οξεία τοξικότητά του από στόματος στα θηλαστικά (Acute oral LD₅₀) είναι 3.500 mg/kg, για ποντίκια. Η μέγιστη επιτρεπόμενη ημερήσια δόση στον άνθρωπο (ADI) είναι 0,3 mg/kg σωματικού βάρους και το μέγιστο αποδεκτό όριο υπολειμμάτων (MRL) στα σταφύλια 10 mg/kg (Λέντζα-Ρίζου, 1994, The Pesticide Manual, 1994). Ανάλυση των υπολειμμάτων του iprodione γίνεται με αερια χρωματογραφία (GC) και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Τα υπολείμματα στην περίπτωση της αέριας χρωματογραφίας ανιχνεύονται με ανιχνευτές ECD και NPD. (ανάλυση των παραπάνω όρων γίνεται στο 2^ο κεφάλαιο)

Τα σκευάσματα που κυκλοφορούν στην Ελληνική αγορά είναι τα Rovral 50% WP και Rovral 25.5 FL., της εταιρείας PON ΠΟΥΛΕΝΚ- ΑΓΡΟΧΗΜΙΚΑ, ΕΛΛΑΣ.

1.4 Η Άμπελος και η Προστασία της από το Βοτρύτη

Η Άμπελος

Η χρήση του καρπού της αμπέλου από τον άνθρωπο φαίνεται ότι άρχισε από την 7^η ή 6^η π.Χ. χιλιετηρίδα, από τις αρχές δηλαδή της Νεολιθικής περιόδου. Η καλλιέργεια της αμπέλου πρέπει να άρχισε λίγο αργότερα, περί την 5^η π.Χ. χιλιετηρίδα. Ειδικά για τον ελλαδικό χώρο, η χρησιμοποίηση των σταφυλιών για διατροφή ανάγεται στις αρχές της 4^{ης} π.Χ. χιλιετηρίδας, ενώ η αρχή της καλλιέργειας τοποθετείται στα μέσα της 3^{ης}, όπου τοποθετείται και η αρχή της οиноποίησης (Σταύρακας, 1997α).

Όλες οι ποικιλίες της οиноφόρου αμπέλου που καλλιεργούνται σήμερα ανήκουν στο είδος *Vitis vinifera* (Linne), και συγκεκριμένα στο υποείδος *V. vinifera sativa* D.C.. [Γένος *Vitis* (Turnefort), υπογένος *Euvitis* (Planchon)] (Σταύρακας, 1997β).

Σήμερα καλλιεργούνται πάνω από 80 εκατομμύρια στρέμματα παγκοσμίως και δίνουν παραγωγή περίπου 60 εκατομμύρια τόνους. Η καλλιεργούμενη έκταση και η παραγωγή στην Ευρώπη αντιπροσωπεύει το μισό περίπου των παγκόσμιων δεδομένων. Η Γαλλία, φημισμένη για τα κρασιά της, είναι η δεύτερη οиноπαραγωγός χώρα στον κόσμο, με πρώτη την Ιταλία, (Επιτροπή Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, 1988). Η χώρα μας είναι 14^η στην παγκόσμια παραγωγή οίνου, 8^η στην παραγωγή επιτραπέζιων σταφυλιών, και 4^η στην παραγωγή σταφίδας. Η αμπελοκαλλιέργεια αντιπροσωπεύει περίπου το 4.5% της συνολικής καλλιεργούμενης έκτασης της Ελλάδας και αποτελεί το 3.5% του κοινοτικού αμπελώνα και το 1.7% του παγκόσμιου (Σταύρακας, 1997α).

Είναι μια καλλιέργεια με μεγάλη σημασία παγκοσμίως τόσο για το παραγόμενο κρασί όσο και για τα επιτραπέζια σταφύλια και τη σταφίδα. Τα επιτραπέζια σταφύλια είναι διεθνώς πολύ σπουδαίο εμπόρευμα. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι ο όγκος των σταφυλιών που εισάγονται στις αγορές της Ευρώπης υπερβαίνει αυτόν οποιουδήποτε άλλου προϊόντος (International Trade Center UNCTAD/GATT, 1987).

Από τι πιο σημαντικές οينوποιήσιμες ποικιλίες για την Ελλάδα είναι ο Ροδίτης, με συνώνυμα, Ρογδίτης, Ροϊδίτης, Αλεπού, Ροδομούσι, κ.α. Πρόκειται για ποικιλία που καλλιεργείται από παλιά στη χώρα μας. Καλλιεργείται σε όλη σχεδόν την αμπελουργική Ελλάδα και είναι ιδιαίτερα εντοπισμένη στην Αττική, την Εύβοια, τη Βοιωτία, τη Βόρεια και Δυτική Πελοπόννησο. Ο Σταύρακας (1997β) δίνει τα παρακάτω στοιχεία για την ποικιλία ροδίτης. Αμπελογραφικά χαρακτηριστικά: Δίνει σταφυλή μεγάλη, κυλινδροκωνική και καμιά φορά πετριγωτή, μέσης πυκνότητας. Ράγα μέτρια προς μεγάλη, σφαιροκωνοειδή, χρώματος λευκορόδινου ανομοιογενούς, έως ροδίνου. Είναι ποικιλία ζωηρή, παραγωγική, με στρεμματική απόδοση που μπορεί να ξεπεράσει τα 2.000 κιλά. Προτιμά εδάφη βαθειά, πλούσια, δροσερά, αργιλοασβεστώδη. Είναι ευαίσθητη στον περονόσπορο, το μολυσματικό εκφυλισμό και την ανθόροια. Φθάνει στο στάδιο της βιομηχανικής ωρίμανσης από τα μέσα

Σεπτεμβρίου έως τα μέσα Οκτωβρίου, ανάλογα με την περιοχή. Από την ποικιλία ροδίτης παράγονται εκλεκτής ποιότητας ξηροί, λευκοί και ρόδινοι, οίνοι, καθώς και ρετσίνες. Σε αναλογία 1/1 με το Σαββατιανό δίνει τον οίνο ‘ονομασίας προέλευσης ανώτερης ποιότητας’ με το όνομα ‘Αγχιάλος’. Μόνη της η ποικιλία δίνει τον οίνο ‘ονομασίας προέλευσης ανώτερης ποιότητας’ με το όνομα ‘Πάτρα’. Σταφύλια του Ροδίτη από κλώνους με τραγανή σάρκα χρησιμοποιούνται σε ορισμένες περιοχές για επιτραπέζια χρήση.

Βοτρύτης και προστασία της αμπέλου

Μια σημαντική ασθένεια της αμπέλου είναι η τεφρά σήψη (grey rot, grey mold, gray mold) που οφείλεται στο μύκητα *Botrytis cinerea*. Ο παθογόνος μύκητας αναπτύσσεται επι υγιών, γηρασμένων, εξασθενημένων ή νεκρών φυτικών ιστών. Προσβάλλει φυτά κάθε ηλικίας, και όλα σχεδόν τα όργανα των φυτών. Ειδικά στην άμπελο προσβάλλει όλα τα πράσινα υπέργεια μέρη του πρέμνου αλλά ιδιαίτερα σημαντικές είναι οι ζημιές που προκαλεί στα σταφύλια λίγο πριν και μετά από τη συγκομιδή (προ- και μετασυλλεκτικές σήψεις). Ο βοτρύτης (*Botrytis cinerea* και η τέλεια μορφή *Botryotinia fuckeliana*) είναι η πιο σημαντική αιτία καταστροφής ή υποβάθμισης των φορτίων επιτραπέζιων σταφυλιών (Cappellini et.al., 1986) και αποτελεί κύριο εμπόδιο στη μεταφορά και αποθήκευσή τους (Scrano et.al., 1991). Είναι αξιοσημείωτο και ενδιαφέρον ότι ο ίδιος μύκητας είναι υπεύθυνος για το φαινόμενο της λεγόμενης ‘ευγενούς σήψεως’ (noble rot) των σταφυλιών που προκαλείται κάτω από ορισμένες κλιματολογικές και εδαφικές συνθήκες. Η ευγενής σήψη παρατηρείται σε μερικές περιοχές της Ευρώπης, ιδίως στη Γαλλία, και είναι ιδιαίτερα επιθυμητή στην οινοποιία. Η ανάπτυξη της ευγενούς σήψης έχει σαν αποτέλεσμα να παράγεται γλεύκος με υψηλή συγκέντρωση σακχάρου, (30-40 %), χωρίς την παράλληλη αύξηση της ολικής οξύτητας. Ο οίνος που παράγεται από τέτοιο γλεύκος είναι πολύ αρωματικός και υψηλής ποιότητας.

Η συχνότερη και σοβαρότερη ζημιά από την ασθένεια εκδηλώνεται στα σταφύλια κατά το φθινόπωρο, όταν πλησιάζουν την ωρίμανση. Στην επιφάνεια μερικών ραγών εμφανίζεται μια διάχυτη καστανή κηλίδα η οποία επεκτείνεται τόσο

σε έκταση όσο και σε βάθος. Η ράγα χάνει τη γυαλιστερή της όψη και η επιδερμίδα αποκολλάται με ελαφρά πίεση του δακτύλου. Αργότερα η προσβολή επεκτείνεται σε όλη τη σάρκα με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια μαλακή και υδαρής σήψη. Τελικά οι προσβλημένοι ιστοί γίνονται καστανοί, χάνουν υγρασία, ζαρώνουν και συχνά 'μουμιοποιούνται'. Με υψηλή υγρασία, η σήψη εξαπλώνεται εύκολα και γρήγορα στις ράγες που βρίσκονται σε επαφή με τις προσβλημένες. Επίσης προσβάλλονται οι ράχες των βότρινων και παρουσιάζουν καστανές νεκρωτικές κηλίδες. Όταν η ατμόσφαιρα παραμένει υγρή, τα προσβλημένα όργανα καλύπτονται από τη χαρακτηριστική τεφρά εξάνθηση του παρασίτου. Οι εξανθήσεις αυτές είναι άφθονες και πυκνές και αποτελούνται από τους κονιδιοφόρους και τα κονίδια του μύκητα. Επάνω ή μέσα στους προσβλημένους ιστούς είναι δυνατό να σχηματιστούν τα σκληρώτια του μύκητα τα οποία είναι μικρά, μελανά, συχνά επίπεδα σώματα μορφής 'κρούστας' μεγέθους 1-5mm. Με υγρή και βροχερή άνοιξη μπορεί να εμφανισθούν προσβολές των τρυφερών κληματίδων, φύλλων, και ανθέων.

Αίτιο της ασθένειας είναι ο μύκητας *Botrytis cinerea* που ανήκει στους Hyphomycetales οικ. Moniliaceae των Αδηλομυκήτων. Σχηματίζει κονιδιοφόρους που αποτελούνται από ένα μακρύ στέλεχος καστανής απόχρωσης ο οποίος φέρει στη κορυφή του, επί μακρών κατ' εναλλαγή εκφυόμενων διακλαδώσεων, υαλώδη κονίδια κατά κεφαλές υπό μορφή βότρυος. Τα κονίδια παράγονται επί βραχέων στηριγμάτων και είναι ωοειδή ή σφαιρικά, μονοκύτταρα, λεία, διαστάσεων 10-15 X 6-10 μm. Η τέλεια μορφή του παρασίτου ονομάζεται *Botryotinia fuckeliana* συν. *Sclerotinia fuckeliana*, ανήκει στη τάξη Helotiales των δισκομυκήτων και σχηματίζεται από τα σκληρώτια, τα οποία βλαστάνοντα υπο ειδικές συνθήκες, παράγουν αποθήκια. Συνήθως τα σκληρώτια όταν βλαστάνουν δίνουν μυκήλιο ή κονιδιοφόρους. Επιβιώνει με τη μορφή μυκηλίου επι νεκρών φυτικών ιστών σαπροφυτικά, επι προσβλημένων καλλιεργούμενων και αυτοφυών καθώς επίσης με τα σκληρώτιά του. Δεν είναι ευαίσθητος στις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας και μπορεί να αναπτυχθεί μεταξύ 1⁰ και 30⁰ C. Όμως η υψηλή σχετική υγρασία του περιβάλλοντος (συχνές βροχοπτώσεις, ομίχλες, καιρός νεφοσκεπής) αποτελεί μια απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη της ασθένειας. Με ευνοϊκές συνθήκες υγρασίας αναπτύσσεται πολύ γρήγορα το μυκήλιο και σχηματίζονται άφθονοι κονιδιοφόροι με τεράστιο αριθμό κονιδίων.

Τα κονίδια βλαστάνουν ταχύτατα στις σταγόνες του νερού και προκαλούν νεες μολύνσεις με απευθείας διάτρηση της εφυμενίδας ή μέσω πληγών. Η ελευθέρωση και διασπορά των κονιδίων γίνεται κυρίως με τον άνεμο (ξηροσπόρια) και σε μικρότερη κλίμακα με τις ψεκάδες του νερού. Διασπορά των μολυσμάτων και μεταφορά τους σε υγιή φυτά γίνεται ακόμη με τα χέρια, τα ρούχα και τα εργαλεία που χρησιμοποιούνται για τη εκτέλεση των καλλιεργητικών φροντίδων ή τη συγκομιδή.

Οι μολύνσεις των σταφυλίων φαίνεται ότι οφείλονται κυρίως στην προσβολή των ανθέων που γίνεται την άνοιξη. Ο μύκητας εισέρχεται από το στίγμα και το στύλο ή και τα άλλα ανθικά μέρη και προκαλεί μια λανθάνουσα μόλυνση στους άωρους καρπούς, η οποία όμως εξαπλώνεται το φθινόπωρο με την έναρξη ωριμάνσεως των σταφυλίων, και προκαλεί σήψη των ραγών (Παναγόπουλος, 1993). Ο Σταύρακας (1997α) αναφέρει ότι στην επιδερμίδα των ραγών υπάρχουν στομάτια τα οποία δεν λειτουργούν την περίοδο της ωριμάνσεως. Καθένα τους περιβάλλεται από μια στεφάνη από φελλοποιημένα, νεκρά, περιστοματικά κύτταρα. Τα νεκρά αυτά κύτταρα έχοντας χάσει την ελαστικότητα τους, περιβάλλονται από μια ρωγμή των επιφανειακών ιστών η οποία δημιουργείται από την αύξηση του όγκου της ράγας. Από τη ρωγμή αυτή μπορεί να εισέλθει στη ράγα ο βοτρυτής. Μολύνσεις σταφυλίων γίνονται ακόμα και από πληγές που προκαλούνται από έντομα, ωίδιο, χαλάζι, τραυματισμό κατά τη συγκομιδή, κ.α. Ειδικά για της πληγές από έντομα, σημαντικό πρόβλημα προκαλεί η Ευδεμίδα της αμπέλου. Πρόκειται για το έντομο *Lobesia botrana* Sciffermueller, ένα λεπιδόπτερο της οικογένειας Tortricidae. Εκτός της άμεσης ζημιάς στις ράγες, από τα τέλεια 1^{ης} και 2^{ης} γενιάς, η προσβολή δημιουργεί πληγές από τις οποίες εισέρχεται ο βοτρυτής, κυρίως το φθινόπωρο (Τσιτσιπής, 1997).

Μόλυνση των ώριμων ραγών μπορεί να γίνει και με απευθείας διάτρηση της εφυμενίδας από κονίδια που βλαστάνουν στην επιφάνεια. Οι προσβολές αυτές εξαρτώνται κυρίως από την περιεκτικότητα των ραγών σε σάκχαρο και από το χρονικό διάστημα που η σχετική υγρασία είναι πάνω από 92% ή υπάρχει ελεύθερο νερό στην επιφάνεια. Στις περισσότερες περιπτώσεις, σοβαρή επιδημική έξαρση της σήψεως εμφανίζεται μετά από βροχοπτώσεις πριν τη συγκομιδή. Συχνές βροχοπτώσεις και θερμοκρασίες μεταξύ 15⁰-25⁰ C αποτελούν άριστες συνθήκες για σήψεις σταφυλίων.

Καταπολέμηση

1. Στις υγρές περιοχές όπου εμφανίζεται συχνά η σήψη των σταφυλιών συνιστώνται τρεις ψεκασμοί την άνοιξη, στο στάδιο της άνθησης, αμέσως μετά την άνθηση, και πριν αρχίσει η διόγκωση των ραγών. Το φθινόπωρο, μετά την έναρξη της ωριμάνσεως των σταφυλιών συνιστάται ένας τουλάχιστον ψεκασμός. Ένας δεύτερος ψεκασμός εφαρμόζεται μια έως δυο εβδομάδες πριν από τη συγκομιδή. Τα μυκητοκτόνα που συνιστώνται για την καταπολέμηση της ασθένειας ανήκουν στις ακόλουθες κατηγορίες: Α) Οργανικά ευρέως φάσματος δράσης όπως τα dichlofluanid, chlorothalonil, captan, thiram. Β) Διασυστηματικά όπως τη ομάδα των βενζιμιδαζολικών: benomyl, carbendazim, thiophanate methyl, και Γ) Ειδικής δράσης, της ομάδας των δικαρβοξιμιδικών: iprodione, procymidone και vinclozolin. Τα φάρμακα των ομάδων Β και Γ πρέπει να χρησιμοποιούνται εναλλακτικά ή σε μίγματα με αυτά της κατηγορίας Α για τη αποφυγή ανάπτυξης ανθεκτικότητας του παθογόνου. Τα οργανικά μυκητοκτόνα προκαλούν συνήθως επιβράδυνση της ζυμώσεως του γλεύκους όταν εφαρμόζονται σε οиноποιήσιμα σταφύλια τις τρεις τελευταίες εβδομάδες πριν τη συγκομιδή.
2. Λήψη μέτρων για την αποφυγή πληγών όπως καταπολέμηση της ευδεμίδας και του ωϊδίου, και προσεκτικοί χειρισμοί των σταφυλιών κατά την εκτέλεση των καλλιεργητικών εργασιών και κατά τη συγκομιδή.
3. Εφαρμογή συστήματος κλαδέματος και κατάλληλο ξεφύλλισμα για τον καλύτερο αερισμό των σταφυλιών.
4. Αποφυγή υπερβολικής αζωτούχου λιπάνσεως.
5. Στα επιτραπέζια σταφύλια συνήθως αντιμετωπίζεται με μετασυλλεκτική μεταχείριση με διοξείδιο του θείου (Marois et.al., 1986), αλλά και με χρήση δικαρβοξιμιδικών, τα οποία προστατεύουν ικανοποιητικά τα σταφύλια για πάνω από ένα μήνα, αλλά δεν φθάνουν σε αποτελεσματικότητα το διοξείδιο του θείου (Pappadopoulou-Mourkidou, 1991, Scrano et.al., 1991).

Στην περιοχή Νέας Αγχιάλου Ν. Μαγνησίας οι συνθήκες υγρασίας δεν είναι πολύ ευνοϊκές για μεγάλη και σοβαρή επιδημική έξαρση της σήψεως από βοτρυτή. Όμως εφαρμόζονται συνήθως ψεκασμοί για την προστασία των σταφυλιών κοντά στη συγκομιδή λόγω της προσβολής από την ευδεμίδα και της πιθανής δευτερεύουσας

προσβολής από το βοτρυτή (Παππάς, μη δημοσιευμένα δεδομένα). Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητο να ελεγχθεί το επίπεδο των υπολειμμάτων των συνήθως χρησιμοποιούμενων μυκητοκτόνων τόσο στα σταφύλια όσο και στο κρασί.

2.Υπολείμματα

2.1 Γενικά

Υπολείμματα και μεταβολίτες

Ως υπολείμματα (residues) γεωργικών φαρμάκων θεωρούνται ουσίες ή μίγματα ουσιών που βρίσκονται στην τροφή των ανθρώπων ή των ζώων και προέρχονται από τη χρησιμοποίηση γεωργικών φαρμάκων. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται και οι ουσίες που είναι προϊόντα διάσπασης, μεταβολισμού (σχετικοί μεταβολίτες) ή χημικής αντίδρασης εφ' όσον είναι τοξικολογικά σημαντικές (FAO, 1981).

Σχετικοί μεταβολίτες (relevant metabolites) είναι όλα τα παράγωγα της δραστικής ουσίας τα οποία σχηματίζονται μετά από την εφαρμογή ενός φαρμάκου και τα οποία είτε έχουν τον ίδιο τοξικολογικό μηχανισμό δράσης με τη δραστική ουσία, είτε έχουν χαρακτηριστεί βιολογικώς ενεργά σε τοξικολογικές μελέτες, είτε προκύπτουν σε ποσότητες μεγαλύτερες από το 10% των αρχικών δόσεων που εφαρμόστηκαν (Klein et.al. 1993). Ειδικά για το νερό, σε περίπτωση μεταβολίτη άγνωστης τοξικότητας, αυτή πρέπει να ελέγχεται όταν η συγκέντρωσή του ξεπερνά το επίπεδο του 0,1μg/l (Council of Europe, 1995). Ενδιαφέρει δηλαδή το ποσό και η τοξικότητα μιας ουσίας εκτός από την παρουσία της στο προϊόν ή το νερό. Η αποικοδόμηση των γεωργικών φαρμάκων παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό συνήθως λιγότερο αλλά μερικές φορές περισσότερο τοξικών για τους οργανισμούς ουσιών (Georgacacis and Khan, 1971).

Τοξικότητα

Όπως προαναφέρθηκε, ενδιαφέρει το αν μια ουσία είναι τοξική ή όχι στα θηλαστικά, εκτός από την παρουσία της σε ένα προϊόν. Η τοξικότητα των ουσιών διακρίνεται σε οξεία, υποξεία ή υποχρόνια, και χρόνια. Η εκτίμηση της τοξικότητας μιας ουσίας είναι περίπλοκο θέμα που απαιτεί πολλές μελέτες όπως αυτές της οξείας τοξικότητας, της χρόνιας τοξικότητας, τοξικότητας επί της αναπαραγωγής ή μεταβολισμού στα θηλαστικά και άλλες. Πάντως η οξεία τοξικότητα στα θηλαστικά

φαίνεται ότι έχει σημασία μόνο στην περίπτωση των δηλητηριάσεων με γεωργικά φάρμακα, κάτι που συμβαίνει πολύ σπάνια, και σε περιπτώσεις ουσιών με πολύ υψηλή οξεία τοξικότητα. Ειδικά για τα μυκητοκτόνα, ελάχιστα από αυτά έχουν υψηλή οξεία τοξικότητα, με εξαίρεση αυτά που βασίζονται σε ιόντα βαρέων μετάλλων. Για τα περισσότερα οργανικά μυκητοκτόνα έχει βρεθεί αδύνατο να παρατηρηθεί οξεία τοξικότητα σε πειραματόζωα παρά μόνο με πολύ υψηλές δόσεις που δεν μπορούν να χορηγηθούν με την γεωργική χρήση των σκευασμάτων. Μόνο το cycloheximide και το fenaminosulf έχουν AO-LD₅₀ λιγότερο από 10 και 100 mg/kg βάρους πειραματόζωου αντιστοίχως. Τα περισσότερα από τα άλλα μυκητοκτόνα έχουν AO-LD₅₀ από 1.000 έως 10.000 mg/kg ή και περισσότερο (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992). Αυτό που ενδιαφέρει περισσότερο είναι τα αποτελέσματα στον οργανισμό μετά από χρόνια, όταν λαμβάνονται συχνά πολύ μικρές ποσότητες, η χρόνια τοξικότητα δηλαδή. Η υποχρόνια αφορά κυρίως του εκτιθέμενους λόγω επαγγέλματος όπως εργάτες βιομηχανιών φαρμάκων και γεωργούς.

Η τοξικότητα μιας ουσίας είναι μια ιδιότητά της ενώ η βλάβη που μπορεί να προκαλέσει είναι θέμα χρήσης. Το κατά Gadamer's δόγμα της τοξικολογίας διευκρινίζει ότι καμία ουσία δεν είναι δηλητήριο από μόνη της αλλά όλα εξαρτώνται από τη δόση της, ή αλλιώς: 'τίποτα δεν είναι δηλητήριο και όλα είναι δηλητήρια-η δόση κάνει το δηλητήριο', που έχει πει ο Ελβετός ιατρός, αλχημιστής και φιλόσοφος Theophrastus Paracelsus (1493-1541). Για πρακτικούς λόγους έχει καθιερωθεί από τους διεθνείς οργανισμούς ένας όρος που μας δίνει μια εκτίμηση της τοξικότητας για κάθε ουσία. Ο όρος αυτός είναι η Ημερήσια Αποδεκτή Δόση (Acceptable Daily Intake- ADI) και ορίζεται σαν η ποσότητα της ουσίας σε mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα που μπορεί να καταναλώνει ένας άνθρωπος ή άλλο ζώο, για όλη του τη ζωή χωρίς βλάβη της υγείας, με βάση τα δεδομένα της επιστήμης την εποχή που γίνεται ο καθορισμός της. Ο καθορισμός της ADI είναι σχετικά δύσκολος λόγω της αβεβαιότητας που πάντοτε υπάρχει στον καθορισμό της δόσης ή Επιπέδου που Δεν Επιφέρει πλέον κανένα Παρατηρήσιμο Αποτέλεσμα που να μπορεί να αξιολογηθεί εφαρμόζοντας όλες τις γνωστές τεχνικές της τοξικολογίας (No Observable Effect Level, NOEL). Αφού εκτιμηθεί η ποσότητα NOEL λαμβάνεται κάποιος συντελεστής ασφαλείας για τον καθορισμό της ADI. Έτσι η ADI μπορεί να είναι από NOEL/100

μέχρι NOEL/1000, όταν υπάρχουν ιδιαίτεροι λόγοι προβληματισμού για την τιμή NOEL (Λέντζα-Ρίζου, 1997α, Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 1991α).

Μέγιστο Αποδεκτό Όριο Υπολειμμάτων

Για να ελέγχεται αν τα φάρμακα χρησιμοποιούνται στις ενδεικνυόμενες δόσεις ώστε να προστατεύεται η υγεία των καταναλωτών και να διευκολύνεται το διεθνές εμπόριο, καθιερώθηκε ο όρος Μέγιστο Αποδεκτό Όριο Υπολειμμάτων (Maximum Residue Limit, MRL) που εκφράζεται σε mg δραστικής ουσίας /kg προϊόντος για κάθε συνδυασμό καλλιέργειας- φυτοφαρμάκου. MRL είναι η μέγιστη ποσότητα του γεωργικού φαρμάκου (μητρικών μορίων ή τοξικών μεταβολιτών) που παραμένει μετά από χρήση σύμφωνα με την Ορθή Αγρονομική Πρακτική (Good Agricultural Practice, GAP) δηλαδή χρήση σύμφωνα με τις ενδείξεις της ετικέτας και φυσικά με βάση την έγκριση του σκευάσματος (Λιαπής, 1997, Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 1991β). Πάντως για τη διαπίστωση της έκτασης που μπορεί να έχει η παρουσία ενός γεωργικού φαρμάκου και των μεταβολιτών του στα τρόφιμα γίνονται μελέτες σε όλα τα είδη προϊόντων τόσο για την περίπτωση που έγινε επέμβαση με την προτεινόμενη δόση, όσο και για περιπτώσεις υψηλότερων δόσεων.

Τα MRLs προκύπτουν από στοιχεία από εποπτευόμενα πειράματα αγρού (supervised trials). Θα πρέπει να τονιστεί ότι τα MRLs και τα ADIs προκύπτουν από τελείως διαφορετικές βάσεις δεδομένων, πειράματα στον αγρό τα πρώτα και τοξικολογικά δεδομένα τα δεύτερα. Γενικά ισχύει ότι τα MRLs πρέπει να είναι αποδεκτά από τοξικολογικής άποψης, αν για παράδειγμα δεν έχει καθοριστεί ADI για μια ουσία δεν συνιστώνται MRLs, (Λέντζα-Ρίζου, 1994, Λιαπής, 1997).

Για τον καθορισμό του MRL ενός φαρμάκου σε κάποιο γεωργικό προϊόν λαμβάνεται υπόψη η τιμή της ADI, το βάρος του ανθρώπου και το ποσοστό συμμετοχής του προϊόντος στην καθημερινή διαίτα ενός λαού, θεωρώντας ότι ο μέσος όρος ισχύει και για κάθε άτομο. Λαμβάνοντας υπόψη το ποσοστό συμμετοχής της τομάτας π.χ. στη διαίτα των ελλήνων και των γερμανών, τα MRLs θα έπρεπε να καθοριστούν σε διαφορετικό ύψος, αφού ο ελληνικός λαός καταναλώνει πολύ μεγαλύτερες ποσότητες τομάτας και μάλιστα καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Για να μην δημιουργούνται προβλήματα στο εμπόριο, διεθνείς οργανισμοί έχουν αναλάβει

τον εναρμονισμό των MRLs ώστε να εξυπηρετεί το εμπόριο χωρίς να αποβαίνει εις βάρος του λαού ενός κράτους. Τέλος, το άθροισμα των MRLs ενός φαρμάκου στα διάφορα προϊόντα μιας χώρας δεν πρέπει να υπερβαίνει την ADI.

Διεθνείς οργανισμοί και εθνικές υπηρεσίες

Ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO) σε συνεργασία με την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (WHO) συνέστησαν ειδική επιτροπή, την Codex Alimentarius Committee, που μελετά τα θέματα που σχετίζονται με την ποιότητα των τροφίμων γενικά. Ειδικότερα τα υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων αποτελούν αντικείμενο ειδικής υποεπιτροπής, της Codex Committee on Pesticide Residues (CCPR), αποτελούμενης από επιστήμονες όλων των χωρών. Η επιτροπή αυτή ύστερα από συντονισμένες έρευνες και μελέτες των τοξικολογικών ιδιοτήτων των δραστικών ουσιών, καθορίζει την ADI ή το MRL για κάθε μια από αυτές. Επίσης η επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (Commission) έχει περιλάβει στις δραστηριότητές της και το πρόγραμμα των υπολειμμάτων. Με ειδικές οδηγίες (directives) καθορίζει τα MRLs και επιβάλλει στα κράτη-μέλη, με παρακολούθηση (monitoring) των προϊόντων, να εξακριβώνουν αν τα προϊόντα ανταποκρίνονται στα όρια που θεσπίστηκαν. Τα θέματα που αφορούν τα γεωργικά φάρμακα εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης ρυθμίζονται βάσει της οδηγίας 91/414/EEC περί φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Στην Ελλάδα οι αρμοδιότητες του ελέγχου είναι κατακερματισμένες σε πολλές υπηρεσίες. Το Γενικό Χημείο του Κράτους έχει αναλάβει ένα μεγάλο μέρος των ελέγχων αυτών. Επίσης, έλεγχος υπολειμμάτων γίνεται από τη Διεύθυνση Φυτοπροστασίας και το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο. Σε χώρες του εξωτερικού γίνονταν αναλύσεις πολύ πριν καθιερωθούν και στη Χώρα μας. Μόνο στη Σοβιετική Ένωση έγιναν περισσότερες από μισό εκατομμύριο αναλύσεις το 1974 για τον έλεγχο υπολειμμάτων (Freshe, 1975).

Πειράματα αγρού (field experiments)

Στις μελέτες υπολειμμάτων, πρωταρχικής σημασίας είναι ο σχεδιασμός του πειράματος προκειμένου να έχουμε δείγματα γεωργικού προϊόντος που περιέχουν υπολείμματα αντιπροσωπευτικά ανάλογα με τη χρήση που έγινε (Lykken, 1963).

Τα πειράματα γίνονται με χρησιμοποίηση εμπορικών σκευασμάτων και όχι εργαστηριακών παρασκευασμάτων επειδή η μορφή του σκευάσματος επηρεάζει την υποβάθμιση. Η εφαρμογή γίνεται ομοιόμορφα και με τρόπο ανάλογο της γεωργικής πρακτικής. Οι διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν τα υπολείμματα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και απαιτείται ένας αριθμός επαναλήψεων για την στατιστική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Σε όλες τις μελέτες χρειάζεται μάρτυρας, δηλαδή πειραματικό τεμάχιο στο οποίο δεν γίνεται εφαρμογή.

Η τύχη των υπολειμμάτων στο φυτό

Το ποσό των υπολειμμάτων που παραμένουν σε ένα γεωργικό προϊόν εξαρτάται από το είδος του προϊόντος, το φυτοπροστατευτικό σκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε και το χρόνο που πέρασε μετά την εφαρμογή του. Οι παράγοντες οι οποίοι σε συνδυασμό με το χρόνο καθορίζουν το ύψος των υπολειμμάτων είναι: α) ο μεταβολισμός μέσα στο φυτό και β) η αποικοδόμηση ή διάσπαση της ουσίας από επίδραση αβιοτικών παραγόντων. Και οι δύο παράγοντες εξαρτώνται από την ακτινοβολία, τη θερμοκρασία και τη σχετική υγρασία. Οι κύριες οδοί μεταβολισμού είναι: οξείδωση, αναγωγή, υδρόλυση, αφυδρογόνωση, αφυδραλογόνωση, απακυλίωση, ισομερείωση, σύζευξη και ανταλλαγή (Μηλιάδης, 1997).

Η συγκέντρωση των υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων στα φυτά μειώνεται με μια από τις εξής διεργασίες:

α) Εξάτμιση. Τις πρώτες ημέρες μετά την επέμβαση, από μελέτες που έγιναν στην Ελλάδα (Liapis et.al., 1994, Liapis et.al., 1995), και αλλού (Vettorazzi, 1976), προέκυψε ότι ορισμένα γεωργικά φάρμακα παρουσιάζουν μείωση των υπολειμμάτων τους που μπορεί να φθάσει το 60% ή και παραπάνω. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το γεωργικό φάρμακο παραμένει ακόμα στην επιφάνεια του φυτού και δεν έχει διεισδύσει στους ιστούς.

β) Ανάπτυξη φυτού. Με το διπλασιασμό του βάρους ενός καρπού υποδιπλασιάζεται η συγκέντρωση των υπολειμμάτων (φυσική αραίωση, dilution effect) ακόμα κι αν δεν υπάρχει καμία αποικοδόμησή τους. Η διεργασία αυτή έχει σημασία σε προϊόντα με γρήγορη και μεγάλη αύξηση-ανάπτυξη του καρπού, όπως τα κολοκυνθοειδή. Επίσης με την αύξηση του μεγέθους των διαφόρων τμημάτων του φυτού, τα επιφανειακά

υπολείμματα των φαρμάκων επαφής κυρίως 'εκτείνονται' σε πολύ μεγαλύτερη επιφάνεια και εκτίθενται περισσότερο στους κλιματικούς παράγοντες που τα επηρεάζουν (Μηλιάδης, 1997).

γ) Μεταβολισμός μέσα στο φυτό. Οι ουσίες που εισέρχονται στους φυτικούς ιστούς υπόκεινται σε μεταβολισμό σχηματίζοντας απλούστερες συνήθως ενώσεις, τους μεταβολίτες. Οι μεταβολίτες μετακινούνται επίσης εντός των ιστών και μεταβολίζονται μέχρι τελικά το σχηματισμό ανόργανων ενώσεων, όπως CO_2 , NH_3 και H_2O . Ο μεταβολισμός μπορεί να οφείλεται σε χημικές αντιδράσεις με τα συστατικά του φυτού ή σε ενζυματικές αντιδράσεις. Συνήθως είναι μόρια λιγότερο τοξικά αλλά υπάρχουν και αντίθετες περιπτώσεις.

δ) Κλιματικοί παράγοντες. Η θερμοκρασία επηρεάζει την ταχύτητα της εξάτμισης, της διείσδυσης, της μετακίνησης και του μεταβολισμού των υπολειμμάτων στο φυτό. Η βροχή απομακρύνει τα φάρμακα που βρίσκονται στην επιφάνεια, ενώ η αυξημένη σχετική υγρασία αυξάνει την ταχύτητα διείσδυσης στους ιστούς. Η κίνηση του αέρα (άνεμος) επηρεάζει την εξάτμιση και μπορεί επίσης να απομακρύνει ποσότητα σκευάσματος που έχει εναποτεθεί σε στερεή μορφή. Η ηλιακή ακτινοβολία προκαλεί φωτολυτικές διασπάσεις και συνεπώς μείωση του ύψους των υπολειμμάτων.

Στη συνέχεια δίνονται στοιχεία για τη δειγματοληψία, την αποθήκευση, την επιλογή της αναλυτικής μεθόδου και τη διαδικασία της ανάλυσης.

2.2 Δειγματοληψία (sampling)

Οι αναλύσεις υπολειμμάτων αποτελούν μια άκρως εξειδικευμένη κατηγορία ελέγχου που παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες. Η τάση να μειώνονται τα MRLs επιβάλλει μια αύξηση της ευαισθησίας των μεθόδων ανάλυσης με συνέπεια την αύξηση και των δυσκολιών και προβλημάτων επιτυχούς προσδιορισμού.

Η δειγματοληψία, ένα σημείο που πρέπει να προσέξουμε ιδιαίτερα στην ανάλυση υπολειμμάτων, προηγείται τόσο χρονικά όσο και ουσιαστικά. Η γεωργική παραγωγή ελέγχεται δειγματοληπτικά αφού ο έλεγχος του συνόλου της είναι φυσικά αδύνατος. Οι αναλύσεις είναι δαπανηρότατες, απαιτούν εξοπλισμό, αναλώσιμα,

εξειδικευμένο προσωπικό και τα προϊόντα που αναλύονται δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν έπειτα για κατανάλωση. Η δειγματοληψία αποτελεί έναν κρίκο της αλυσίδας ανάλυσης, η οποία αλυσίδα είναι τόσο ανθεκτική όσο ο ασθενέστερος κρίκος της. Ποιά η αξία βελτίωσης των μεθόδων ανάλυσης και μείωσης των ορίων ευαισθησίας όταν το σφάλμα της ανάλυσης υπάρχει ήδη μέσα στην αντιπροσωπευτικότητα του δείγματος. Επίσης, καμία αναλυτική μέθοδος ή στατιστική επεξεργασία, δεν είναι δυνατόν να διορθώσει πλήρως σφάλματα που έγιναν κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας.

Ακριβώς επειδή έχει επισημανθεί η σπουδαιότητα της σωστής δειγματοληψίας, έγινε κατά τα τελευταία χρόνια σημαντική προσπάθεια ώστε τα σφάλματα να προσδιορίζονται και να μειώνονται. Έγινε χρήση και επεξεργασία στατιστικών υπολογισμών και καθορίστηκαν οδηγίες για την κατά το δυνατόν αντιπροσωπευτικότερη δειγματοληψία. Οι FAO/WHO έχουν εκδώσει δύο σχετικές οδηγίες. Η μία αφορά τις πειραματικές εφαρμογές φυτοφαρμάκων (supervised trials) και τις δειγματοληψίες που γίνονται για μελέτες υποβάθμισης και τον καθορισμό της ημερομηνίας τελευταίας εφαρμογής πριν τη συγκομιδή. Η δεύτερη αφορά τον συνιστώμενο τρόπο δειγματοληψίας σε φορτία του εμπορίου. Αντίθετα, η μέθοδος που προτείνεται από την Ε.Ε. εφαρμόζεται σε φρούτα και λαχανικά του εμπορίου. Όπως φαίνεται η μέθοδος δειγματοληψίας είναι στενά συνδεδεμένη με το σκοπό της ανάλυσης και επιλέγεται ανάλογα με αυτόν.

Σκοπός

Ο σκοπός της διαδικασίας δειγματοληψίας είναι η λήψη κατάλληλης ποσότητας γεωργικού προϊόντος για να χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση. Τονίζεται ότι τα δείγματα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικά και τυχαία. Αυτό δεν σημαίνει ότι λαμβάνονται 'στην τύχη', αλλά ότι υπάρχει η ίδια πιθανότητα να περιέχεται σε αυτά κάθε μονάδα του όλου πειραματικού τεμαχίου ή φορτίου.

Κανόνες δειγματοληψίας για πειραματικές εφαρμογές φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων

Έχει διαπιστωθεί ότι σπάνια υπάρχει ομοιόμορφη εφαρμογή του γεωργικού φαρμάκου στον αγρό και σε πολλές περιπτώσεις δεδομένα αποθέσεως, μετά από προσεκτική εφαρμογή τους από θέση σε θέση στο ίδιο πειραματικό τεμάχιο, έχουν βρεθεί να διαφέρουν αρκετά. Γενικά η επιλογή των σημείων δειγματοληψίας γίνεται είτε τυχαία ή με μια συγκεκριμένη διάταξη ή επιλεκτικά από προκαθορισμένα σημεία.

Ο μάρτυρας, δηλαδή δείγμα από τεμάχιο όπου δεν έγινε επέμβαση με το γεωργικό φάρμακο, πρέπει: α) να είναι αρκετό σε ποσότητα, β) να παίρνεται κάθε φορά που γίνεται δειγματοληψία, και γ) να μην παίρνεται από τα περιθώρια του πειραματικού τεμαχίου του μάρτυρα για αποφυγή επιμολύνσεων από τα γειτονικά τεμάχια.

Οι γενικοί κανόνες που ισχύουν τόσο για τα κυρίως δείγματα όσο και για το μάρτυρα, είναι:

1. Επιλέγονται απολύτως υγιή φυτά ή μέρη αυτών και κανονικής ανάπτυξης, όπως ακριβώς θα συγκομίζονταν για την κατανάλωση.
2. Δεν απομακρύνονται τα επιφανειακά κατάλοιπα των γεωργικών φαρμάκων (σκούπισμα, πλύσιμο, κ.α.) κατά τη λήψη ή συσκευασία των δειγμάτων.
3. Λαμβάνεται επαρκής ποσότητα για όλες τις πιθανές επαναλήψεις των αναλύσεων στο εργαστήριο.
4. Πρέπει να αποφεύγεται η επιμόλυνση των δειγμάτων κατά τη λήψη και μεταφορά-αποστολή. Για το σκοπό αυτό πρέπει: α) να χρησιμοποιούνται απολύτως καθαρά εργαλεία (μαχαίρια, ψαλίδια) β) να αποφεύγεται η επαφή των δειγμάτων με χέρια ή ρούχα που ήρθαν σε επαφή με γεωργικό φάρμακο (συνιστάται η χρησιμοποίηση γαντιών μιας χρήσης από πολυαιθυλένιο), γ) οι σακούλες των δειγμάτων να είναι από πολυαιθυλένιο και ικανοποιητικής αντοχής, δ) τα δείγματα να μην εκτίθενται σε ακραίες συνθήκες και ε) να μην μεταφέρονται δείγματα μαζί με γεωργικά φάρμακα.

Ειδική προσοχή πρέπει να δίνεται στα δείγματα του μάρτυρα τα οποία λαμβάνονται πριν από τα άλλα δείγματα ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνσή τους από τα εργαλεία ή τα χέρια.

Για το μέγεθος των δειγμάτων και τις λεπτομέρειες του τρόπου λήψης αυτών πρέπει να ακολουθούνται οι οδηγίες που εκδίδουν διεθνείς οργανισμοί. Στον πίνακα που ακολουθεί δένεται η παλαιότερη και η νέα οδηγία των FAO/WHO για το ελάχιστο μέγεθος των δειγμάτων γεωργικών προϊόντων από πειραματικούς αγρούς, για τα σταφύλια και άλλα φρούτα (FAO/WHO, 1986).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.: Οδηγίες για το ελάχιστο μέγεθος δείγματος γεωργικών προϊόντων από πειραματικούς αγρούς για ανάλυση υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων. FAO/WHO, 1986.

ΦΡΟΥΤΑ	Παλαιότερη οδηγία	Νέα οδηγία
Σταφύλια	2 kg	12 βότρυες ή μέρη από 12 βότρυες, από χωριστά πρέμνα, ώστε να δίνουν τελικό βάρος τουλάχιστον 1 kg.
Εσπεριδοειδή	5 kg	24 καρποί από διάφορα σημεία του δέντρου, από τουλάχιστον 4 δέντρα. Περισσότεροι καρποί, αν είναι απαραίτητο, ώστε το ελάχιστο βάρος να είναι 2 kg.
Μικρά πυρηνόκαρπα (π.χ. κεράσια)	2 kg	1 kg από διάφορα σημεία του δέντρου, από τουλάχιστον 4 δέντρα.
Μεγάλα πυρηνόκαρπα (π.χ. βερίκοκα, ροδάκινα)	2 kg	2 kg
Φράουλες	2 kg	1 kg από 12 τουλάχιστον διαφορετικά σημεία.

Όροι που χρησιμοποιούνται (Ambrus, 1984a, Ambrus, 1984b)

- Φορτίο (lot): ονομάζεται μια διακριτή ποσότητα προϊόντος που θεωρείται ότι έχει ομοιόμορφα χαρακτηριστικά όπως προέλευση, ποικιλία, consignor, συσκευασία, κ.α.
- Αρχικό δείγμα (primary sample): μια ποσότητα προϊόντος που λαμβάνεται από μία θέση του φορτίου.
- Ολικό δείγμα (bulk sample): συνδυασμός όλων των αρχικών δειγμάτων του ίδιου φορτίου.

- Τελικό δείγμα (final sample): ονομάζεται το μέρος του ολικού δείγματος (ή όλο αυτό) που θα χρησιμοποιηθεί για ανάλυση.
- Εργαστηριακό δείγμα (laboratory sample): το μέρος του τελικού δείγματος που φθάνει στο εργαστήριο. Από αυτό θα ληφθούν τα αναλυτικά δείγματα.
- Αναλυτικό δείγμα (analytical sample): ονομάζεται το μέρος του εργαστηριακού δείγματος το οποίο αναλύεται. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν θεωρούνται αντιπροσωπευτικά του όλου δείγματος.

2.3 Αποθήκευση

Τα δείγματα πρέπει να αναλύονται το ταχύτερο δυνατόν μετά τη συλλογή τους ώστε να αποφευχθούν φυσικές και χημικές μεταβολές.

Το αναλυτικό δείγμα μπορεί να διατηρείται για λίγο σε ψύξη ή κατάψυξη. Μακροχρόνια αποθήκευση προκαλεί μεταβολές όπως, απομάκρυνση του νερού που περιέχει το δείγμα, κυρίως στην επιφάνεια. Στην περίπτωση που απαιτείται μακροχρόνια αποθήκευση είναι προτιμότερο να εκχυλίζουμε το δείγμα και αφού απομακρύνουμε τον διαλύτη, να αποθηκεύσουμε το εκχύλισμα στους -20°C ή και χαμηλότερα. Σε τέτοιες θερμοκρασίες η ταχύτητα των αντιδράσεων διάσπασης είναι πάρα πολύ μικρή.

2.4 Επιλογή αναλυτικής μεθόδου

Για την επιλογή μιας αναλυτικής μεθόδου λαμβάνονται υπόψη τα παρακάτω:

1. Η διεθνής βιβλιογραφία, αναζητούνται δηλαδή οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί στο συγκεκριμένο αντικείμενο.
2. Η αξιολόγηση μιας μεθόδου από πολλά συνεργαζόμενα εργαστήρια συγχρόνως (collaborative study).
3. Η δυνατότητα που παρέχει η μέθοδος για ταυτόχρονο προσδιορισμό περισσότερων της μίας ουσιών. Τέτοιες μέθοδοι που ονομάζονται πολυδύναμες ή πολυϋπολειμματικές (multiresidue methods) είναι πολύ χρήσιμες όταν δεν είναι γνωστό το φυτοπροστατευτικό σκεύασμα που έχει χρησιμοποιηθεί.

4. Η ικανότητα της μεθόδου για προσδιορισμό ουσιών σε συγκεντρώσεις αρκετά μικρότερες από το ανώτατο επιτρεπτό όριο (MRL).
5. Η ικανότητα προσαρμογής της μεθόδου σε ένα μέσο εργαστήριο ανάλυσης υπολειμμάτων εφοδιασμένο με όργανα ρουτίνας.
6. Ο σκοπός της ανάλυσης, αν δηλαδή η ανάλυση γίνεται για έλεγχο, έρευνα, επιβολή κυρώσεων κ.α. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου χρειάζεται μια ταχεία, όχι ιδιαίτερα ακριβής μέθοδος και περιπτώσεις όπου απαιτείται η μέγιστη δυνατή ακρίβεια.

Η τάση σήμερα των διεθνών οργανισμών (FAO, WHO) για την διευκόλυνση του διεθνούς εμπορίου και για την προστασία των καταναλωτών είναι να γίνουν αποδεκτές από όσα το δυνατόν περισσότερα κράτη, μέθοδοι ελεγμένες από μελέτες συνεργαζόμενων εργαστηρίων (collaborative studies). Με αυτόν τον τρόπο αποκλείονται μέθοδοι με αμφίβολα αποτελέσματα και προσεγγίζεται περισσότερο ο τελικός στόχος να αναφέρεται μαζί με τα ανώτατα επιτρεπτά όρια και η μέθοδος με την οποία προσδιορίζονται.

2.5 Αναλύσεις Υπολειμμάτων

Μέθοδοι προσδιορισμού

Οι μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων διακρίνονται σε πολυδύναμες (multi-residue methods) που προσδιορίζουν πολλές διαφορετικές ουσίες ταυτόχρονα και εξειδικευμένες (specific methods). Με την εφαρμογή εξειδικευμένων μεθόδων κάτω από ιδανικές συνθήκες, είναι δυνατό να προσδιοριστούν περίπου 200 ουσίες και λίγοι μεταβολίτες (Λέντζα-Ρίζου, 1997α). Με τις πολυδύναμες μεθόδους προσδιορίζονται κυρίως φυτοφάρμακα της ίδιας οικογένειας, όπως οργανοφωσφορικά, οργανοχλωριωμένα κλπ. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για προκαταρκτικό έλεγχο (screening) και αναπτύχθηκαν για να διευκολύνουν τον έλεγχο ρουτίνας των αγροτικών προϊόντων (monitoring). Μόνες τους όμως δεν αρκούν για την επισημάνση και τον προσδιορισμό του συνολικού ρυπαντικού φορτίου ενός δείγματος. Για τις δραστικές ουσίες περισσότερων από τα μισά σκευασμάτων που κυκλοφορούν, απαιτείται η χρήση εξειδικευμένων μεθόδων (Λέντζα-Ρίζου, 1997α).

Τα επίπεδα των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων είναι συνήθως της τάξης των 1-1000 ng/kg ή ppb (μέρη ανά δισεκατομμύριο). Η ανάλυση υπολειμμάτων είναι δηλαδή ιχνοανάλυση αφού προσδιορίζονται σε κάθε γραμμάριο του δείγματος ένα έως χίλια νανογραμμάρια της ουσίας. Η ιχνοανάλυση φθάνει σήμερα σε μέγιστη ακρίβεια της τάξης των φέμτογκραμ ($fg=10^{-15}$ gr.) δηλαδή μπορούμε να προσδιορίσουμε ποσοτικά περίπου ένα εκατομμύριο μόρια, εφόσον το βάρος των μορίων είναι της τάξης του 10^{-21} gr., με βάση τη σταθερά Avogadro.

Χρήσιμο είναι να παρατηρηθεί ότι οι δυνατότητες του εργαστηρίου αναλύσεων υπολειμμάτων είναι περιορισμένες. Για παράδειγμα είναι αδύνατον να γνωματεύσει την πλήρη απουσία γεωργικών φαρμάκων σε κάποιο φυτικό δείγμα. Αυτό γιατί υπάρχουν περίπου 500 δραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στην Ελλάδα σε διάφορες μορφές σκευασμάτων. Θα πρέπει λοιπόν να υπάρχει υπόνοια για συγκεκριμένα γεωργικά φάρμακα που πιθανόν χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο προϊόν, προκειμένου να προσανατολιστεί η ανάλυση του εργαστηρίου προς αυτά τα φάρμακα.

Σήμερα οι απαντήσεις δίνονται με τη μορφή: 'Δεν υπάρχουν υπολείμματα του φαρμάκου X σε ανιχνεύσιμες ποσότητες' ή 'Στο δείγμα προσδιορίστηκε το φάρμακο X σε συγκέντρωση ψ mg/kg' (Μηλιάδης, προφορική επικοινωνία).

Η αξιοπιστία μιας ανάλυσης εξαρτάται από σειρά παραγόντων όπως: α) το προσωπικό, β) το εργαστήριο, γ) τα υλικά και τα αντιδραστήρια, και δ) η εφαρμογή κανόνων καλής εργαστηριακής πρακτικής.

α) Ο αναλυτής του εργαστηρίου έχει πολύ μικρότερο περιθώριο σφάλματος στην ανάλυση υπολειμμάτων σε σχέση με τους περισσότερους από τους υπόλοιπους τύπους ανάλυσης. Για το λόγο αυτό απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό που να κατανοεί απόλυτα τη σημασία του κάθε σταδίου της εργασίας και να καταγράφει κάθε αναγκαστική παρέκκλιση. Επίσης απαιτείται συνεχής εκπαίδευση του προσωπικού μέσα στο εργαστήριο.

β) Το εργαστήριο. Οι ιδανικές συνθήκες είναι αυτές του καθαρού χώρου (clean-room laboratory) όπου διοχετεύεται αέρας μέσα στο εργαστήριο, οπότε ο χώρος βρίσκεται 'υπό αυξημένη πίεση' απαγορεύοντας σε σκόνη, σωματίδια κλπ. να εισβάλουν στο

χώρο και να επιμολύνουν τα δείγματα. Επίσης να υπάρχει, αν είναι δυνατόν, ξεχωριστός χώρος για τα όργανα από αυτόν όπου χρησιμοποιούνται οι διαλύτες.

γ) Υλικά και αντιδραστήρια. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι εξαιρετικά καθαροί. Για το σκοπό αυτό κυκλοφορούν στο εμπόριο διάφοροι τύποι καθαρότητας όπως: 'for gas chromatography', 'for HPLC' κ.α. Το νερό που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι απεσταγμένο και πολλές φορές να έχει περάσει από ειδικά φίλτρα (νερό HPLC). Τα γυαλικά απαιτούν επίπονο καθαρισμό που είναι ξέπλυμα με ακετόνη, πλύσιμο με ειδικό απορρυπαντικό, ξέπλυμα με ακετόνη και στέγνωμα σε φούρνο. Μερικές φορές τοποθετούνται σε συσκευή υπερήχων για πολύ καλό καθαρισμό.

δ) Εφαρμογή κανόνων καλής εργαστηριακής πρακτικής.

Οι κανόνες αυτοί σε γενικές γραμμές είναι: Λήψη όλων των μέτρων προφύλαξης (γυαλιά ασφαλείας, γάντια, ποδιές εργαστηρίου κ.α.). Αποφυγή, αν είναι δυνατόν, χρησιμοποίησης τοξικών διαλυτών και αντιδραστηρίων. Πλήρης επισήμανση, με ετικέτες, όλων των περιεκτών, αναφέροντας και την ημερομηνία παρασκευής των διαλυμάτων. Επίσης πολύ σημαντική είναι η καταγραφή σε ημερολόγιο από τον κάθε αναλυτή των εργασιών της ημέρας.

Καθιέρωση μιας αναλυτικής μεθόδου (validation)

Για να χρησιμοποιηθεί μια αναλυτική μέθοδος από το εργαστήριο υπολειμμάτων πρέπει πρώτα να ελεγχθεί για μια σειρά από παράγοντες που καθορίζουν την αξία της και οι οποίοι είναι:

- Η ειδικότητα (specificity) δηλαδή ο αριθμός των ουσιών που μπορούν να ανιχνευθούν με τη μέθοδο.
- Η εκλεκτικότητα (selectivity) δηλαδή η κατά προτίμηση ανίχνευση μιας ή περισσότερων ουσιών.
- Η ευαισθησία (sensitivity) που δείχνει τη μικρότερη ποσότητα μιας ουσίας που μπορεί να ανιχνευθεί.
- Το όριο προσδιορισμού (limit of quantitation ή limit of determination) που είναι το όριο πάνω από το οποίο μπορεί να επιτευχθεί ποσοτική μέτρηση με ικανοποιητικό βαθμό αξιοπιστίας.

- Το όριο ανίχνευσης (limit of detection) δηλαδή η ελάχιστη ποσότητα μιας ουσίας που μπορεί να ανιχνευθεί ποιοτικά.
- Η επαναληψιμότητα (repeatability) των αποτελεσμάτων.
- Η απόδοση της μεθόδου, δηλαδή η ανάκτηση (recovery) επί τοις εκατό για τη δραστική ουσία, ή οποία ελέγχεται αναλύοντας δείγματα που έχουν ‘επιμολυνθεί’ με την δραστική ουσία. Τα δείγματα αυτά ονομάζονται φορτισμένα δείγματα (fortified samples ή spiked samples).

Διαδικασία Ανάλυσης

Από τη στιγμή που φθάνει το δείγμα στο εργαστήριο και μέχρι τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων, ακολουθείται μια διαδικασία που περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- 1) Προετοιμασία αναλυτικού δείγματος,
- 2) Εκχύλιση,
- 3) Καθαρισμός,
- 4) Συμπύκνωση, και
- 5) Προσδιορισμός.

2.5.1 Προετοιμασία Αναλυτικών Δειγμάτων

Δείγματα και διαδικασία προετοιμασίας

Αναλυτικό δείγμα (analytical sample) ονομάζεται το μέρος του εργαστηριακού δείγματος το οποίο αναλύεται. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν θεωρούνται αντιπροσωπευτικά του όλου δείγματος.

Ο σκοπός της προετοιμασίας του αναλυτικού δείγματος είναι η λήψη μιας πλήρως αντιπροσωπευτικής μερίδας του εργαστηριακού δείγματος ή ένα συγκεκριμένο μέρος αυτού, ανάλογα με το σκοπό της ανάλυσης. Το πρώτο βήμα στην προετοιμασία του αναλυτικού δείγματος είναι ο διαχωρισμός των μεμονωμένων ‘τεμαχίων’ που θα χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση. Το δεύτερο βήμα είναι το κόσψιμο και η ομογενοποίηση των επιλεγμένων ‘τεμαχίων’. Από το ομογενές υλικό που προκύπτει ζυγίζονται οι ποσότητες που θα αποτελέσουν τα αναλυτικά δείγματα.

Διάφορα επιμέρους στοιχεία της προετοιμασίας αναλυτικών δειγμάτων εξαρτώνται από το σκοπό της ανάλυσης. Μερικές φορές τα δεδομένα της ανάλυσης υπολειμμάτων χρειάζονται για τον υπολογισμό της έκθεσης σε αυτά των καταναλωτών. Σε τέτοιες περιπτώσεις πρέπει να αναλύεται το εδώδιμο μέρος του γεωργικού προϊόντος ή να εκτιμάται η μείωση της συγκέντρωσης των υπολειμμάτων ως αποτέλεσμα των χειρισμών στους οποίους υπόκειται πριν καταναλωθεί όπως πλύσιμο, αποφλοιώση, κ.α.

Τα υπολείμματα των γεωργικών φαρμάκων δεν είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα μέσα ή πάνω στα γεωργικά προϊόντα και τα φυτά. Η κατανομή τους εξαρτάται κυρίως από τη φύση του φυτικού υλικού, τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των ουσιών- υπολειμμάτων και τον τρόπο εφαρμογής. Οι ουσίες που δρουν δια επαφής παραμένουν στην επιφάνεια, δεισδύοντας μόνο ελάχιστα στα κηρώδη στρώματα. Οι διασυστηματικές κυκλοφορούν μέσα στο φυτό. Τα υπολείμματα υδρόφιλων μορίων βρίσκονται συγκεντρωμένα στο υδατώδες μέρος του προϊόντος, ενώ αυτά των λιπόφιλων στο ελαιώδες ή κηρώδες μέρος αυτού. Στον Πίνακα 2. (FAO/WHO, 1979) δίνονται κάποια παραδείγματα για τα ποσοστά υπολειμμάτων στο φλοιό ορισμένων γεωργικών προϊόντων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.: Κατά προσέγγιση ποσοστά % υπολειμμάτων που ανιχνεύθηκαν στο φλοιό (FAO/WHO, 1979).

Ουσία	Εσπεριδοειδή	Μήλα	Πατάτες
Aldicarb	80	--	--
Chinomethionate	95	95	--
Cypermethrin	90	90	--
Fenthion	95	--	--
Chlorpropham	--	--	65
Ethiofencarb	--	--	57

Είναι προφανές ότι ο όρος φλοιός σε περιπτώσεις γεωργικών προϊόντων όπως τα μήλα ή οι πατάτες, δεν μπορεί να καθοριστεί επακριβώς αφού ένας προσωπικός

παράγοντας επηρεάζει το αποτέλεσμα ακόμα και αν καθοριστεί ο λόγος βάρους του φλοιού προς το υπόλοιπο προϊόν.

Μια άλλη πηγή ανομοιογένειας αποτελεί το μέσο εφαρμογής. Σκευάσματα που ψεκάζονται με ψεκαστικά μεγάλου όγκου συχνά συγκεντρώνονται στο κατώτερο άκρο των φρούτων, όπως έδειξαν τα αποτελέσματα αναλύσεων που έγιναν σε δείγματα αχλαδιών με διθειοκαρβαμιδικά (FAO/WHO, 1980). Η ανομοιογενής κατανομή των υπολειμμάτων εσωτερικά και η ανομοιόμορφη (επιφανειακή) εναπόθεσή τους πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στην προετοιμασία των αναλυτικών δειγμάτων.

Είναι πολύ σημαντικό να ακολουθούνται πάντα οι ίδιες διαδικασίες για να εξασφαλιστούν συγκρίσιμα και επαναλήψιμα αποτελέσματα. Έτσι πρέπει να εφαρμόζεται στην προετοιμασία του αναλυτικού δείγματος σε επιβλεπόμενα πειράματα για τον καθορισμό ανωτάτων ορίων υπολειμμάτων (MRLs) η ίδια μέθοδος που εφαρμόζεται και σε κανονικούς ελέγχους της αγοράς.

Σε τρία σημεία, που επηρεάζουν την προετοιμασία των δειγμάτων, πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή:

Πρώτον, τα αποτελέσματα της ανάλυσης πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικά της αγρονομικής πρακτικής που ακολουθήθηκε. Ο σκοπός της θέσπισης των MRLs είναι και η παροχή ενός αντικειμενικού μέτρου ελέγχου της καλής αγρονομικής πρακτικής. Εξ'ορισμού τα MRLs δεν πρέπει να υπερβληθούν όταν τα φυτοφάρμακα εφαρμόζονται σύμφωνα με τους συνιστώμενους τρόπους, που είναι αποδεκτοί στο σύνολό τους ως Ορθή Αγρονομική Πρακτική (Good Agricultural Practice, GAP). Κατά τη διάρκεια των εργασιών της 13ης Συνόδου της CCPR, ορισμένες χώρες αντιτέθηκαν στην πρακτική ανάλυσης των εσπεριδοειδών με ομογενοποίηση ολόκληρου του καρπού (Codex Alimentarius Commission, 1981). Όμως πολλά αποτελέσματα δείχνουν ότι τα υπολείμματα, στην περίπτωση των εσπεριδοειδών, βρίσκονται κυρίως στο φλοιό, ενώ η σάρκα περιέχει υπολείμματα κάτω του ορίου ανίχνευσης, ακόμα και αν έγινε χρήση διπλάσιων ή ακόμα μεγαλύτερων δόσεων από τις συνιστώμενες. Συνεπώς τα αποτελέσματα των αναλύσεων μόνο της σάρκας δεν μπορούν να καταδείξουν τις παραβιάσεις των κανονισμών ούτε να χρησιμοποιηθούν για τον καθορισμό του MRL.

Δεύτερον, τα αποτελέσματα πρέπει να είναι επαναλήψιμα. Υπολείμματα χρώματος, προσβλημένα, αποσυντεθημένα ή ξερά φύλλα και καρποί, πρέπει να απομακρύνονται κατά την προετοιμασία των δειγμάτων, αφού είναι πηγές σφάλματος. Όσον αφορά την αποφλοίωση, μια μεταχείριση μη επαναλήψιμη (πατάτες, μήλα, αχλάδια) και επειδή η ρύπανση των κομματιών είναι αναπόφευκτη κατά τη διαδικασία αυτή, η καλύτερη λύση, αναλογιζόμενοι την επαναληψιμότητά της, είναι η ομογενοποίηση και ανάλυση ολόκληρου του καρπού.

Τρίτον, η διαδικασία πρέπει να είναι πρακτική και απλή. Υπάρχουν γεωργικά προϊόντα για τα οποία η εφαρμογή της αρχής του ‘ολόκληρου προϊόντος’ θα προκαλούσε δυσεπίλυτα προβλήματα. Για παράδειγμα η ανάλυση ολόκληρων πυρηνοκάρπων (βερικοκών, ροδακίνων), αμυγδάλων, καρυδιών, φουντουκιών και άλλων προϊόντων που έχουν σκληρά μέρη, θα απαιτούσε πολύ ειδικό εργαστηριακό εξοπλισμό. Σε τέτοιες περιπτώσεις είναι απαραίτητος κάποιος συμβιβασμός, οπότε επιτρέπεται η ανάλυση μόνο του εδώδιμου μέρους.

Σημαντικά βήματα προς τη εναρμόνιση των μεθόδων διεθνώς έχουν γίνει από την CCPR. Οι προτεινόμενες από την επιτροπή αυτή μέθοδοι παρέχουν μια πολύ καλή πρακτική προσέγγιση στις κυριότερες ανάγκες για την προετοιμασία των αναλυτικών δειγμάτων και συνιστάται να ακολουθούνται από όλα τα εργαστήρια που ασχολούνται με εποπτευόμενα πειράματα και συστηματικούς ελέγχους.



Πρακτικά ζητήματα

Μετά τον διαχωρισμό του τμήματος του προϊόντος που θα αναλυθεί πρέπει να γίνει η ομογενοποίησή του. Αυτή μπορεί να γίνει με απλή ανάμειξη εάν πρόκειται για προϊόν υπό μορφή κόνεως (διάφορα άλευρα) ή για φρούτα με τη χρήση κοινών ηλεκτρικών ‘blenders’ οικιακής χρήσεως. Επίσης χρησιμοποιούνται ειδικοί εργαστηριακοί ομογενοποιητές.

Σε περιπτώσεις που τα μεμονωμένα τεμάχια είναι πολύ μεγάλα για να γίνει η ομογενοποίησή τους με τους ανωτέρω τρόπους προηγείται μια χειρονακτική μείωση του δείγματος. Σε αυτή την περίπτωση έχει μεγάλη σημασία να κοπεί ένα αντιπροσωπευτικό τμήμα του καρπού. Αυτό σημαίνει να ισχύει ο ίδιος λόγος επιφάνειας/βάρους και στο τμήμα που θα κοπεί, και κάθε ανομοιόμορφη επιφανειακή

εναπόθεση να αντιπροσωπεύεται (Ambrus, 1984a).

Στις παλαιότερες μεθόδους το αναλυτικό δείγμα ήταν της τάξεως των 100-250 g. Σήμερα με την αύξηση της ευαισθησίας των μεθόδων και την τάση για περιορισμό του όγκου των χρησιμοποιούμενων διαλυτών, το αναλυτικό δείγμα είναι της τάξεως των 15-50 g (Λέντζα-Ρίζου, 1997α).

2.5.2 Εκχύλιση (extraction)

Η εκχύλιση είναι η φάση κατά την οποία οι ουσίες που μας ενδιαφέρουν διαχωρίζονται από τους φυτικούς ιστούς με τη χρήση κατάλληλων εκχυλιστικών διαλυμάτων. Η επιλογή των εκχυλιστικών μέσων είναι καθοριστικής σημασίας για την επιτυχία της ανάλυσης. Επιδιώκεται το μέσον να διαθέτει μεγάλη εκχυλιστική ικανότητα ώστε να μπορεί να διαχωρίσει τα μόρια του φυτοφαρμάκου από του ιστούς του φυτού παράλληλα όμως να είναι αρκετά εκλεκτικό ώστε να αποφεύγεται η συνεκχύλιση ανεπιθύμητων ουσιών από το υπό μελέτη υπόστρωμα (substrate, matrix) δηλαδή το προς ανάλυση προϊόν. Οι πλέον χρησιμοποιούμενοι διαλύτες είναι το κυκλοεξάνιο, το ακετονιτρίλιο, η ακετόνη και ο οξικός αιθυλεστέρας.

Σε αυτό το στάδιο ορισμένη ποσότητα του δείγματος αφού ομογενοποιηθεί σε κατάλληλο 'blender' εκχυλίζεται με κατάλληλο διαλύτη ή μείγμα διαλυτών. Για να πετύχουμε ικανοποιητική εκχύλιση χρησιμοποιούμε αναμίκτη μεγάλων ταχυτήτων (4000-5000 στροφές ανά λεπτό) ενώ το δοχείο εκχύλισης που είναι συνήθως μεταλλικό βρίσκεται μέσα σε υδρόλουτρο ψύξης για την αποφυγή υψηλών θερμοκρασιών. Γίνεται είτε σε κλειστά δοχεία τύπου 'Omni-mixer' είτε σε ανοιχτά τύπου 'Ultra-turrax'. Η εκχύλιση μπορεί να γίνει και με συσκευή 'Soxhlet' που όμως χρησιμοποιείται σε λίγες περιπτώσεις λόγω της διάσπασης των περισσότερων γεωργικών φαρμάκων παρουσία νερού και υψηλών θερμοκρασιών.

Η μέθοδος εκχύλισης είναι πολύ σημαντικό στάδιο και επηρεάζει σημαντικά τα αποτελέσματα των αναλύσεων. Η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης των φορτισμένων δειγμάτων δίνει πληροφορίες για τις απώλειες της προς προσδιορισμό ουσίας που αναμένονται και για τα δείγματα αγρού. Το ποσοστό της αρχικής ποσότητας της ουσίας που ανιχνεύεται στο φορτισμένο δείγμα αφού αναλυθεί,

ονομάζεται ανάκτηση (recovery) και είναι μέτρο της αποτελεσματικότητας όλης της διαδικασίας ανάλυσης και όχι μόνο της εκχύλισης. Ο έλεγχος της εκχύλισης γίνεται με δείγματα που προέρχονται από τον αγρό στον οποίο έγινε εφαρμογή του υπο μελέτη φυτοφαρμάκου τα οποία υποβάλλονται σε εκχύλιση με μια μέθοδο γνωστής εκχυλιστικής ικανότητας και με την υπό εξέταση μέθοδο (Λέντζα-Ρίζου, 1997α). Όταν αναπτύσσεται μια νέα μέθοδος ή όταν εφαρμόζεται μια ήδη γνωστή για μια διαφορετική ουσία πρέπει να ελεγχεται η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και να αναφέρεται στην περιγραφή την νέας μεθόδου. Παρ' όλο που αυτό φαίνεται αυτονόητο, στην πράξη, παρατηρείται συχνά το αντίθετο. Λίγες αναφορές υπάρχουν στη βιβλιογραφία για την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης ενώ τα στοιχεία δείχνουν ότι καθιερωμένες μέθοδοι εκχύλισεως διαφέρουν στην αποτελεσματικότητα έως και 35% (Visi, 1984).

2.5.3 Καθαρισμός (clean up)

Η διαδικασία καθαρισμού είναι ίσως το πιο σημαντικό στάδιο στην ανάλυση υπολειμμάτων, αφού το εκχύλισμα που παραλαμβάνουμε από το προηγούμενο στάδιο περιέχει εκτός από την απειροελάχιστη ποσότητα γεωργικού φαρμάκου και πολλά συνεκχυλίσματα (coextractives) τα οποία προέρχονται από το φυτικό υπόστρωμα. Η συγκέντρωσή τους είναι 10^5 ή και μεγαλύτερη τις περισσότερες φορές σε σχέση με αυτήν του γεωργικού φαρμάκου (Μηλιάδης, 1996). Τέτοιες ουσίες μπορεί να είναι αμίνες, φαινόλες, οργανικά οξέα, σάκχαρα, φυτικά λίπη και έλαια, χλωροφύλλη, κ.α.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι που εξαρτώνται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του γεωργικού φαρμάκου και των συνεκχυλισμάτων. Μια μέθοδος καθαρισμού είναι η κατανομή μεταξύ δυο υγρών φάσεων (κατανομή υγρού-υγρού, liquid- liquid partition). Στηρίζεται στους διαφορετικούς συντελεστές κατανομής του φαρμάκου και των συνεκχυλισμάτων μέσα σε δυο μη μιγνυόμενους διαλύτες. Με την κατάλληλη επιλογή ενός διαλύτη τα υπολείμματα ενός φυτοφαρμάκου μπορούν να διαχωριστούν ικανοποιητικά από τις άλλες ουσίες. Μια άλλη μέθοδος, που συνήθως ακολουθεί την προηγούμενη αποτελώντας ένα δεύτερο στάδιο καθαρισμού, είναι η χρωματογραφία στήλης (column chromatography).

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην διαφορετική ταχύτητα εκλούσεως του φυτοφαρμάκου και των συνεκχυλισμάτων μέσα από μια στήλη που περιέχει κατάλληλο χρωματογραφικό υλικό. Ένα χρωματογραφικό σύστημα αποτελείται από μια στατική φάση ή υλικό προσρόφησης (stationary phase ή adsorbent) όπως αλουμίνα, γη διατόμων, ενεργό άνθρακα, κ.α., και μια κινητή φάση ή εκλουστικό διάλυμα (mobile phase ή eluent) που μπορεί να είναι ένας απλός οργανικός διαλύτης ή ένα μείγμα διαλυτών. Ο διαχωρισμός των ουσιών είναι αποτέλεσμα της διαφορετικής προσρόφησης τους στην επιφάνεια του υλικού της σταθερής φάσης.

2.5.4 Συμπύκνωση (concentration)

Ο τελικός όγκος του διαλύματος που παραλαμβάνουμε από το προηγούμενο στάδιο απαιτείται συνήθως να ελαττωθεί σε 1-10 ml με σκοπό την αύξηση της συγκέντρωσης του υπολείμματος. Αυτό επιτυγχάνεται με περιστροφικό εξατμιστή (rotary evaporator) όπου η εξάτμιση γίνεται υπό κενό σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες, συνήθως μέχρι 40°C, για να μην διασπάται η ουσία. Μικροί όγκοι πτητικών διαλυτών μπορούν να εξατμισθούν με ρεύμα καθαρού αζώτου.

Πολλές φορές μετά την συμπύκνωση ακολουθεί 'αλλαγή διαλύτη'. Στην περίπτωση αυτή η συμπύκνωση γίνεται 'μέχρι ξηρού' και έπειτα προστίθεται ο νέος διαλύτης.

Οι όγκοι πρέπει να μετρώνται με μεγάλη ακρίβεια, γιατί επηρεάζουν σημαντικά τον τελικό προσδιορισμό.

2.5.5 Προσδιορισμός (determination)

Η ουσία στο τελικό συμπύκνωμα προσδιορίζεται ποσοτικά με κάποια από τις παρακάτω μεθόδους: αέριο χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC), φασματοφωτομετρία (spectrophotometry), υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) και φασματομετρία μάζας (mass spectrometry). Πολύ πρόσφατα γνωρίζουν ανάπτυξη οι βιοτεχνολογικές μέθοδοι (ανοσοδοκιμασίες- immunoassays) (Λέντζα-Ρίζου, 1997α).

Η αέριος χρωματογραφία είναι η κατ' εξοχήν μέθοδος προσδιορισμού

υπολειμμάτων. Με την τεχνική αυτή μικρή ποσότητα, 1-5μl, από το καθαρό εκχύλισμα εγχύεται στην κορυφή ειδικής θερμαινόμενης στήλης χρωματογραφίας τοποθετημένης σε κλίβανο. Το εκχύλισμα μεταπίπτει σε αέριο φάση και ένα αδρανές αέριο (φέρον αέριο, carrier gas), συνήθως άζωτο ή ήλιο, κινούμενο μέσα στη στήλη παρασύρει τους ατμούς του δείγματος. Ο χρόνος παραμονής κάθε ουσίας στη στήλη (χρόνος κατακράτησης- retention time) αποτελεί τη βάση για τον ποιοτικό προσδιορισμό. Το μέγεθος του σήματος που καταγράφεται από κατάλληλα όργανα (ανιχνευτές) στην έξοδο της στήλης υπό μορφή κορυφής χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό. Αυτό που υπολογίζεται είναι το ύψος της κορυφής (peak) ή η επιφάνεια υπό την κορυφή έπειτα από 'ολοκλήρωση'.

Με τη χρήση εξειδικευμένων ανιχνευτών, π.χ. δέσμευσης ηλεκτρονίων (electron capture detector, ECD), θερμιονικό ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (NPD) και άλλων, ανιχνεύονται και προσδιορίζονται εκλεκτικά μόνο οι ουσίες που ενδιαφέρουν. Σε περιπτώσεις που η ουσία προς προσδιορισμό δεν ικανοποιεί τις συνθήκες του αεριοχρωματογράφου, όπως συμβαίνει με μη πτητικές ή θερμοευαίσθητες ουσίες, είναι δυνατός ο σχηματισμός παραγώγου της ουσίας που να ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις της τεχνικής της αεριοχρωματογραφίας.

2.5.6 Εκτίμηση αποτελεσμάτων

Κάθε στάδιο της αναλυτικής μεθόδου, όπως προαναφέρθηκε, περιλαμβάνει σειρά από κίνδυνους για πιθανό σφάλμα. Για τον έλεγχο τέτοιων σφαλμάτων, παράλληλα με την ανάλυση του κυρίως δείγματος αναλύονται και: α) τυφλό δείγμα αντιδραστηρίων (reagent blank), που περιέχει μόνο του διαλύτες και τα αντιδραστήρια, β) μάρτυρας (control sample), δηλαδή δείγμα χωρίς καθόλου γεωργικό φάρμακο και γ) φορτισμένα δείγματα (spiked ή fortified samples), που είναι μάρτυρες με ορισμένη περιεκτικότητα στην ουσία του φαρμάκου που αναλύεται. Για να είναι ικανοποιητική η μέθοδος πρέπει η ανάκτηση να είναι της τάξεως του 70-110% και η επαναληψιμότητα < 20% σαν σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, R.S.D.) (Council Directive 94/43/EC). Επίσης, μια άγνωστη ουσία θα πρέπει να ταυτοποιείται με περισσότερες από μία αναλυτικές μεθόδους.

2.6 Επίδραση των μεταποιητικών διαδικασιών στα υπολείμματα των φαρμάκων στα φυτικά προϊόντα

Τα ανώτατα επιτρεπτά όρια (MRLs) στις περισσότερες των περιπτώσεων αναφέρονται στα πρωτογενή προϊόντα. Όμως, μεγάλο μέρος των προϊόντων αυτών καταναλίσκονται μετά από οικιακή προετοιμασία ή βιομηχανική επεξεργασία-μεταποίηση. Έχει λοιπόν ενδιαφέρον να διερευνηθεί η τύχη των υπολειμμάτων κατά τις διαδικασίες αυτές.

Τα συμπεράσματα των ερευνών για την τύχη των υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων κατά τις διαδικασίες μεταποίησης και προετοιμασίας των προϊόντων για κατανάλωση, συγκλίνουν στο ότι αυτή είναι κατ' αρχήν συνάρτηση των ιδιοτήτων κάθε γεωργικού φαρμάκου και ιδιαίτερα της διασυστηματικότητάς του, καθώς και της υδατο- ή λιποδιαλυτότητάς του. Τα υπολείμματα των μη διασυστηματικών συνήθως εντοπίζονται στην εξωτερική επιφάνεια των προϊόντων και απομακρύνονται κατά μεγάλο ποσοστό με το πλύσιμο και την αποφλοιώση φρούτων και λαχανικών. Τα λιποδιαλυτά, κυρίως εντομοκτόνα, έχουν την τάση να συγκεντρώνονται στα ελαιοκυστίδια, σε φυτικά προϊόντα σχετικά υψηλής λιποπεριεκτικότητας.

Ενώ οι παλαιότερες μελέτες στο θέμα αναφέρονταν κυρίως στα μητρικά μόρια η επιστημονική πρόοδος έδειξε ότι τα μόρια αυτά αποικοδομούνται και με διάφορες χημικές αντιδράσεις παράγονται νέα μόρια, οι μεταβολίτες. Η γνώση της τοξικολογικής συμπεριφοράς των μεταβολιτών είναι απαραίτητο στοιχείο για την αξιολόγηση των υπολειμμάτων στα μεταποιημένα προϊόντα και οι σύγχρονες έρευνες στρέφονται και προς αυτή την κατεύθυνση. Περαιτέρω έρευνες απαιτούνται για να διαλευκανθεί ο μεταβολισμός κάθε φάρμακου κατά τη θερμική επεξεργασία των φρούτων και λαχανικών που καταναλίσκονται κατά μεγάλο μέρος βρασμένα, καθώς και η τύχη των υπολειμμάτων κατά τις συνηθέστερες διαδικασίες οικιακής ή βιομηχανικής μεταποίησης. Οι έρευνες αυτές θα δώσουν χρησιμότητα στοιχεία που

θα επιτρέψουν την εκτίμηση της πραγματικής ημερήσιας ποσότητας υπολειμμάτων που λαμβάνει ο μέσος καταναλωτής με την τροφή του.

Το πλύσιμο των φρούτων και λαχανικών είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό μέσο για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων των σκευασμάτων που αφήνουν επιφανειακά υπολείμματα, δεν είναι δηλαδή διασυστηματικά. Αντίθετα, οι διασυστηματικές ουσίες απομακρύνονται ελάχιστα έως καθόλου με το πλύσιμο. Ο τρόπος και η διάρκεια του πλυσίματος επίσης το ποσό των υπολειμμάτων που απομακρύνεται. Με το πλύσιμο σπανακιού, κατά τον τρόπο που γίνεται στα εργοστάσια επεξεργασίας του, απομακρύνθηκαν τα υπολείμματα του DDT σε ποσοστά 17% με ελάχιστο πλύσιμο και 48% με μέγιστο πλύσιμο, του ethyl parathion σε ποσοστά 0% και 9% και του carbaryl σε ποσοστά 66% και 87%, με ελάχιστο και μέγιστο πλύσιμο αντιστοίχως, (Geisman, 1975). Υπολείμματα του pirimicarb και των δυο κύριων καρβαμιδικών μεταβολιτών του, σε μαρούλι, μειώθηκαν κατά ποσοστό 38-50% με πλύσιμο με κρύο νερό (FAO, 1976). Γενικά από τα υπάρχοντα δεδομένα προκύπτει ότι με το πλύσιμο τα ποσοστά μείωσης των υπολειμμάτων κυμαίνονται από 0% (deltamethrine σε σιτάρι) μέχρι και 96% (malathion σε τομάτες) (FAO, 1985, Λέντζα-Ρίζου, 1997β).

Πολλές ουσίες παραμένουν στο φλοιό. Ιδιαίτερα στα εσπεριδοειδή οι λιποδιαλυτές ουσίες έχουν την τάση να συγκεντρώνονται στα αιθέρια έλαια του φλοιού. Το γεγονός αυτό καθιστά ασφαλέστερο για τον καταναλωτή το εδώδιμο μέρος των καρπών. Πρόβλημα μπορεί να αποτελέσει κατά την παρασκευή μαρμελάδας ή αιθέριων ελαίων. Σε γενικές γραμμές, τα μη διασυστηματικά φάρμακα παραμένουν κατά ένα μεγάλο μέρος ή και αποκλειστικά εντοπισμένα στο φλοιό των καρπών ή στα εξωτερικά μέρη των λαχανικών και μπορούν να απομακρυνθούν με αποφλοιώση ή απομάκρυνση των εξωτερικών μερών. Αντίθετα τα διασυστηματικά διεισδύουν στο εσωτερικό του φλοιού και των ιστών τόσο κατά τους ψεκασμούς του υπέργειου μέρους των φυτών όσο και κατά τις επεμβάσεις στο έδαφος, οπότε με την αποφλοιώση ελάχιστα υπολείμματα απομακρύνονται.

Η θερμική επεξεργασία των νωπών γεωργικών προϊόντων προκαλεί σημαντική μείωση των υπολειμμάτων πολλών φυτοφαρμάκων, ιδιαίτερα αυτών που υδρολύονται σχετικά εύκολα. Για παράδειγμα, φασολάκια που περιείχαν 2mg/kg benomyl, έπειτα απο βρασμό περιείχαν λιγότερο από το μισό της αρχικής ποσότητας, ενώ το νερό του βρασμού περιείχε την υπόλοιπη ποσότητα του μυκητοκτόνου (FAO, 1983). Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις κατά τις οποίες η θερμική επεξεργασία δεν επιφέρει μείωση των υπολειμμάτων. Η συγκέντρωση cypermethrin και permethrin σε λάχανο δεν μειώθηκε έπειτα από βρασμό για 15 λεπτά (FAO, 1982). Πέρα από τη χημική σταθερότητα των μορίων μια άλλη ιδιότητα που επηρεάζει την τύχη των υπολειμμάτων με το βρασμό είναι η υδατοδιαλυτότητά τους. Τα υδατοδιαλυτά εντομοκτόνα dimethoate και omethoate (μεταβολίτης του πρώτου) μειώνονται σε ποσοστό 60-100% με το βρασμό σε φασολάκια, λάχανο, κουνουπίδι, πιπεριές και τομάτες (FAO, 1985). Αντίθετα, τα υπολείμματα του ελάχιστα υδατοδιαλυτού flucythrinate, το οποίο επί πλέον έχει την ιδιότητα να προσροφάται ισχυρά στους φυτικούς ιστούς, παραμένουν στα βρασμένα προϊόντα στην ίδια συγκέντρωση που περιείχαν και τα νωπά (FAO, 1985). Ιδιαίτερα πρέπει να προσεχθούν ορισμένες ουσίες που με το βρασμό μετατρέπονται σε άλλες περισσότερο τοξικές από τα μητρικά μόρια. Οι πιο γνωστές περιπτώσεις αφορούν ευρέως φάσματος μυκητοκτόνα όπως τα αιθυλενο-διθειοκαρβαμιδικά (maneb, zineb, mancozeb) και προπυλενο-διθειοκαρβαμιδικά (propineb), καθώς και τον ρυθμιστή αύξησης daminozide.

Στην οινοποίηση τα υπολείμματα των φυτοφαρμάκων πρέπει να εξετάζονται: α) για πιθανή αρνητική επίδραση ορισμένων μυκητοκτόνων στους ζυμομύκητες με αποτέλεσμα την αναστολή της οινοποιητικής ζύμωσης, β) για τυχόν επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού, και γ) στα υπολείμματα στο κρασί που είτε για λόγους πραγματικών τοξικολογικών κινδύνων για τους καταναλωτές, είτε για εμπορικούς λόγους, δεν είναι αποδεκτά από εισάγουσες χώρες και προκαλούν σοβαρότατα εμπορικά προβλήματα. Το 1990 σημειώθηκε εμπορικός πόλεμος μεταξύ Η.Π.Α. και Γαλλίας με συνέπεια τη δραματική μείωση των εξαγωγών γαλλικών κρασιών στις Η.Π.Α. Αφορμή ήταν η ανίχνευση σε ορισμένα κρασιά πολυτελείας, υπολειμμάτων του μυκητοκτόνου procymidone, το οποίο δεν έχει έγκριση στις

Η.Π.Α. για τα αμπέλια και ως εκ τούτου σαν ανώτατη αποδεκτή περιεκτικότητα είχε καθοριστεί το όριο ανίχνευσης (Λέντζα-Ρίζου, 1994).

Σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα, ορισμένα μυκητοκτόνα όπως τα δικαρβοξιμιδικά (iprodione, procymidone, vinclozolin) και τα maneb, zineb, mancozeb, δεν έχουν αρνητική δράση στη ζύμωση όταν εφαρμοσθούν στη σωστή δόση. Αντίθετα, τα φθαλιμίδια (folpet, captan, captafol) καθώς και το dichlofluanid έχει αποδειχτεί ότι επηρεάζουν αρνητικά την οينوποιητική ζύμωση αναστέλλοντας τη δράση των ζυμομυκήτων. Η ζύμωση μπορεί να λάβει χώρα μόνο όταν η συγκέντρωση των παραπάνω μυκητοκτόνων μειωθεί με υδρόλυση σε επίπεδο $<0,1 \text{ mg/kg}$ (Cabras et.al., 1987).

Είναι γνωστό ότι ορισμένα φυτοφάρμακα επηρεάζουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες όπως το εντομοκτόνο acephate το οποίο προσδίδει άσχημη οσμή στο κρασί και δεν πρέπει να χρησιμοποιείται στα οينوποιήσιμα σταφύλια (Λέντζα-Ρίζου, 1997β).

Όσον αφορά τα υπολείμματα στο κρασί, σε πολλές περιπτώσεις έχουμε μείωση της συγκέντρωσης μέχρι πλήρη εξαφάνιση των υπολειμμάτων που υπήρχαν στα σταφύλια από τα οποία προήλθε. Το metalaxyl π.χ. προσδιορίζεται στο κρασί σε συγκέντρωση ίση με το 1/3 της συγκέντρωσης του στα σταφύλια (FAO, 1982). Κρασί που παρήχθη από σταφύλια που περιείχαν $1,70$ ή $1,42 \text{ mg/kg}$ περιείχε υπολείμματα σε συγκέντρωση $0,19$ κι $0,03 \text{ mg/kg}$ αντίστοιχα (FAO, 1994). Για να αναφέρουμε κυρίως τα μυκητοκτόνα, έγινε από τον Gennari et.al. (1992), η μελέτη του chlozolate έπειτα από δύο τύπους οينوποίησης (με ή χωρίς την παραμονή στέμφυλων με το γλεύκος). Τα σταφύλια προέρχονταν από δύο αμπελώνες που είχαν δεχθεί επέμβαση με το παραπάνω μυκητοκτόνο και περιείχαν $1,31 \text{ mg/kg}$ chlozolate και $0,18 \text{ mg/kg}$ του μεταβολίτη 3-(3,5-dichloropheny)-5-methyloxazolidine-2,4dione) αυτά του πρώτου αμπελώνα και $0,73$ και $0,10 \text{ mg/kg}$ του δεύτερου, πριν την οينوποίηση. Δεν βρέθηκαν ανιχνεύσιμα υπολείμματα του μητρικού μορίου στο κρασί σε καμία από τις δύο περιπτώσεις. Επίσης, έπειτα από διαύγαση με άνθρακα η συγκέντρωση του μεταβολίτη μειώθηκε σε ποσοστό 97-100% ενώ η μείωση που παρατηρήθηκε μετά από διαύγαση με μίγμα μετετονίτη και ζελατίνης ήταν της τάξεως του 26-36%.

Ανησυχίες υπάρχουν για την ύπαρξη υπολειμμάτων δικαρβοξιμιδικών στο κρασί λόγω της ευρείας χρήσης τους στα σταφύλια για την καταπολέμηση του βοτρυτή. Οι Garcia-Cazorla and Xirau- Vayreda (1994), σε μελέτη τους για τα δικαρβοξιμιδικά iprodione, procymidone και vinclozolin σε οиноποιήσιμα σταφύλια, μούστο και κρασί δίνουν τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.) στον οποίο παρουσιάζουν την εξέλιξη του ύψους των υπολειμμάτων από τρείς διαφορετικές εφαρμογές.

Πίνακας 3.: Εξέλιξη των συγκεντρώσεων υπολειμμάτων δικαρβοξιμιδικών μυκητοκτόνων από σταφύλια σε μούστο και κρασί (Garcia-Cazorla & Xirau-Vayreda, 1994).

Προϊόν	iprodione (mg/kg)	procymidone (mg/kg)	vinclozolin (mg/kg)
Σταφύλια	1.01	0.78	0.37
Μούστος	0.72	0.50	0.22
Κρασί	0.55	0.17	0.08

Επίσης παρουσιάζουν (Πίνακας 4.) τα ποσοστά μείωσης των υπολειμμάτων κατά τα δυο στάδια της οиноποίησής δηλαδή, από σταφύλια σε μούστο και από μούστο σε κρασί.

Πίνακας 4. Ποσοστά μείωσης υπολειμμάτων δικαρβοξιμιδικών μυκητοκτόνων κατά τα στάδια της οиноποίησης (Garcia-Cazorla & Xirau- Vayreda, 1994).

Μυκητοκτόνο	Από σταφύλια σε μούστο %	από μούστο σε κρασί %
iprodione	28.7	23.6
procymidone	35.9	66.0
vinclozolin	40.5	63.6

Από τους Πίνακες 3. και 4. προκύπτει ότι τα procymidone και vinclozolin παρουσιάζουν τα μεγαλύτερα ποσοστά μείωσης υπολειμμάτων κατά την οиноποίηση και συνεπώς (σε σχέση πάντα με το αρχικό τους ύψος) τα λιγότερα υπολείμματα στο

κρασί. Το iprodione παρουσιάζει τη μεγαλύτερη υπολειμματικότητα από τα τρία δικαρβοξυμιδικά και τελικά τα περισσότερα υπολείμματα στο κρασί.

Τα υπολείμματα γεωρικών φαρμάκων στους χυμούς είναι επίσης συνάρτηση των ιδιοτήτων κάθε φυτοφαρμάκου αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις είναι σημαντικά χαμηλότερα απ' ό τι στην πρώτη ύλη. Σε πορτοκάλια που δέχτηκαν μετασυλλεκτική επέμβαση με metalaxyl και περιείχαν 3,5 mg/kg στο φλοιό και 0,09 mg/kg στη σάρκα και χυμοποιήθηκαν τα υπολείμματα στο χυμό ήταν της τάξεως του 0,07 mg/kg (FAO, 1982). Τα υπολείμματα του permethrin, εντομοκτόνου με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα, σε σταφύλια, μήλα, αχλάδια και σε τομάτες, συμπυκνώνονται στο στερεό υπόλειμμα της χυμοποίησης το οποίο χρησιμοποιείται σαν ζωοτροφή άλλα δεν ανιχνεύονται στους χυμούς (FAO, 1979).

Η αποξήρανση είναι από τις διαδικασίες που απαιτούν ιδιαίτερη προσοχή όσον αφορά το ύψος των υπολειμμάτων στα τελικά προϊόντα. Στις περισσότερες περιπτώσεις με την αποξήρανση των φρούτων ή λαχανικών λαμβάνει χώρα αύξηση της συγκέντρωσης των υπολειμμάτων λόγω απώλειας νερού και μείωσης του βάρους του προϊόντος ενώ η ποσότητα της ουσίας παραμένει η ίδια. Τα υπολείμματα του σε ξηρά δαμάσκηνα είναι 2,7 φορές περισσότερα από ό τι στα αντίστοιχα νωπά (FAO, 1977). Τα υπολείμματα του daminozide σε ξηρή πούλπα πορτοκλιών είναι 5,3 φορές περισσότερα από ό τι στα αντίστοιχα νωπά (FAO, 1976). Όμως, σταφίδες που παρήχθησαν από σταφύλια ποικιλίας Thomson seedless που περιείχαν κατά μέσο όρο 0,10 mg/kg περιείχαν ελαφρώς χαμηλότερη συγκέντρωση, 0,08 mg/kg (FAO, 1994).

Οι συνθήκες της κατάψυξης, όπως αναφέρθηκε στην 2.3 παράγραφο, θεωρούνται οι ασφαλέστερες για τη φύλαξη δειγμάτων των γεωργικών προϊόντων που δεν είναι δυνατόν να αναλυθούν αμέσως μετά την άφιξη στο εργαστήριο. Πράγματι, στη θερμοκρασία των -20°C οι μεταβολικές διεργασίες αναστέλλονται. Επομένως δεν αναμένεται αλλαγή της συγκέντρωσης. Όμως, ο γενικός αυτός κανόνας έχει εξαιρέσεις, και για το λόγο αυτό η σταθερότητα κάθε ουσίας κατά την διατήρηση σε κατάψυξη πρέπει να μελετάται πειραματικά. Τα υπολείμματα του thiodicarb

βρέθηκε να παραμένουν αναλλοίωτα για πάνω από 6 μήνες (FAO, 1986). Μαρούλια στα οποία προστέθηκε γνωστή ποσότητα metalaxyl (5 mg/kg) καθώς και μαρούλια που είχαν υποστεί επέμβαση στον αγρό, παρέμειναν σε κατάψυξη επί 81-337 ημέρες. Η συγκέντρωση των υπολειμμάτων που προσδιορίστηκε κατά το πέρας της περιόδου κατάψυξης αντιστοιχούσε στο 114-145% της αρχικής συγκέντρωσης. Η αύξηση αυτή αποδίδεται στη σταθερότητα της ουσίας και στη μείωση του βάρους των δειγμάτων λόγω απώλειας νερού (FAO, 1982). Εξαίρεση στα παραπάνω αποτελεί η περίπτωση του εντομοκτόνου methomyl σε τεμαχισμένες φράουλες. Πειράματα έδειξαν ότι κατά την συντήρηση στους -20°C παρατηρείται σημαντική μείωση των υπολειμμάτων, γεγονός που δεν συμβαίνει με άλλα φυτικά είδη (Wheeler et.al., 1981). Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και με το μυκητοκτόνο chlorothalonil όταν αλεσμένα δείγματα σπανακιού διατηρήθηκαν σε κατάψυξη (MAAF 1994).

Κατά την επεξεργασία ελιάς, ελαιοποίηση και εξευγενισμό ελαίων, τα αποτελέσματα των ερευνών για την τύχη των υπολειμμάτων συγκλίνουν στο ότι με τις συνηθέστερες διαδικασίες αυτά μειώνονται δραματικά. Ενώ η τύχη των υπολειμμάτων κατά την έκθλιψη του ελαιοκάρπου, είναι κυρίως συνάρτηση των ιδιοτήτων κάθε ουσίας και κυρίως της λιποδιαλυτότητάς της. Επίσης ο εξευγενισμός των βρώσιμων φυτικών ελαίων (ραφινάρισμα) συντελεί στην δραστική μείωση των υπολειμμάτων.

2.7 Στοιχεία από τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τα υπολείμματα

Το πρώτο έτος εφαρμογής των οδηγιών του Συμβουλίου της Ευρώπης για τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων ήταν το 1994. Με τις οδηγίες αυτές καθορίζονται ανώτατα όρια και επιβάλλεται στα κράτη-μέλη να προβαίνουν σε συστηματικούς ελέγχους σε εγχώρια και εισαγόμενα προϊόντα και να κοινοποιούν τα αποτελέσματα των αναλύσεων. Η κοινοποίηση αυτή πρέπει να περιλαμβάνει τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν, τις ουσίες που ήταν δυνατό να ανιχνευθούν και να

προσδιοριστούν, τον αριθμό των δειγμάτων που αναλύθηκαν, το ποσοστό των δειγμάτων με ανιχνεύσιμα υπολείμματα, το ποσοστό των δειγμάτων με συγκεντρώσεις που υπερέβαιναν τα κοινοτικά όρια και τα προϊόντα στα οποία βρέθηκαν.

Από την εξέταση των αποτελεσμάτων και σύγκριση των στοιχείων από διαφορές χώρες της Ε.Ε. φαίνεται ότι και στο θέμα των ελέγχων υπολειμμάτων υπάρχει έντονη διαφοροποίηση μεταξύ 'πλούσιων' και 'φτωχών' χωρών.

Ακολουθούν οι πίνακες: 5.) με συγκεντρωτικά στοιχεία ανά χώρα, 6.) με τις υπερβάσεις των MRLs που παρατηρήθηκαν σε ευρωπαϊκό επίπεδο, και 7.) με τις υπερβάσεις που παρατηρήθηκαν σε ελληνικής προέλευσης προϊόντα.

Πίνακας 5.: Συγκεντρωτικά στοιχεία ανά χώρα (Λέντζα-Ρίζου, 1997γ).

ΧΩΡΑ	Δραστικές ουσίες που μπορούσαν να προσδιοριστούν	Συνολικός αριθμός δειγμάτων	Δείγματα με ανιχνεύσιμα υπολείμματα (αριθμός και ποσοστά)	Υπερβάσεις των MRLs (αριθμός και ποσοστά)
ΕΛΛΑΔΑ	5-6	360	Δεν δίνονται	1 (<1%)
ΙΣΠΑΝΙΑ	73	2.965	1182 (31%)	92 (3%)
ΑΓΓΛΙΑ	9-102 ανάλογα με το δείγμα	1.232	505 (41%)	18 (1%)
ΚΑΤΩ ΧΩΡΕΣ	200	12.940	5440 (45%)	356 (3%)
ΣΟΥΗΔΙΑ	209	4.829	2153 (45%)	178 (4%)
ΓΑΛΛΙΑ	Δεν δίνονται	2.816	1250 (44%)	121 (4%)
ΠΟΡΤΟ-ΓΑΛΛΙΑ	72	192	58 (30%)	1 (<1%)

Από τον πίνακα 5. προκύπτει ότι περίπου τα μισά από τα δείγματα που αναλύθηκαν δεν περιείχαν ανιχνεύσιμα υπολείμματα, ενώ το ποσοστό των υπερβάσεων των ανώτατων ορίων σε ευρωπαϊκό επίπεδο τοποθετείται γύρω στο 3%.

Πίνακας 6.: Υπερβάσεις των MRLs που παρατηρήθηκαν σε ευρωπαϊκό επίπεδο (Λέντζα-Ρίζου, 1997γ).

ΠΡΟΪΟΝ	
Σταφύλια	acephate, azinphos-eyhyl, chlorpyrifos, chlozolate, methomyl, monocrotophos, parathion-methyl, pyrazophos
Πατάτες	aldicarb, chlorpropham, methamidophos, tecnazene, thiabendazole
Πορτοκάλια	carbaryl, imazalil, parathion-methyl, pirimiphos-methyl, thiabendazole
Μανταρίνια	carbaryl, chlorfenvinphos, chlorpyrifos
Τομάτες	βρωμιούχα, διθειοκαρβαμικά, imazalil, methamidophos, permethrin, procymidone
Αγγούρια	διθειοκαρβαμικά, acephate, captan, folpet
Καρπούζια	methamidophos
Πεπόνια	bromopropylate, carbendazim, folpet, imazalil, methamidophos

Πίνακας 7.: Υπερβάσεις που παρατηρήθηκαν σε ελληνικής προέλευσης προϊόντα που εξήχθησαν (Λέντζα-Ρίζου, 1997γ).

ΧΩΡΑ ΠΡΟΟΡΙΣΜΟΥ	ΠΡΟΪΟΝ	ΔΡΑΣΤΙΚΗ ΟΥΣΙΑ	mg/kg	MRL
ΣΟΥΗΔΙΑ	Σταφύλια	acephate	0,04	0,02*
	Πορτοκάλια	parathion-methyl	0,33	0,20 national
	Ροδάκινα	aziphos-ethyl	0,06	0,05 national
ΗΝ. ΒΑΣΙΛΕΙΟ	Σταφύλια	monocrotophos	0,08-0,4	-
ΟΛΛΑΝΔΙΑ	Σταφύλια	acephate	0,41	0,02*
		aziphos-ethyl	0,17	0,05
		methomyl	0,18	3
		parathion-methyl	0,38	0,20
		pyrazophos	0,36-0,48	-
	Πορτοκάλια	parathion-methyl	0,94	0,20

* : Όριο αναλυτικού προσδιορισμού (πρακτικά μηδέν).

B.) Πειραματικό μέρος

1. Εισαγωγή

Ο βοτρυτής είναι μια από τις σημαντικότερες ασθένειες της αμπέλου και είναι ιδιαίτερα σοβαρές οι ζημιές που προκαλεί στα σταφύλια λίγο πριν και μετά τη συγκομιδή καθώς και στα φορτία επιτραπέζιων σταφυλιών. Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος αντιμετώπισης της ασθένειας είναι η χρήση μυκητοκτόνων.

Στην περιοχή της Νέας Αγχιάλου οι συνθήκες υγρασίας δεν είναι ευνοϊκές για μεγάλη και σοβαρή επιδημική έξαρση της σήψεως των σταφυλιών από το βοτρυτή. Έτσι οι τρεις ψεκασμοί την άνοιξη για τις υγρές περιοχές που συνιστά ο Παναγόπουλος (1993) (στο στάδιο της άνθησης, αμέσως μετά την άνθηση, και πριν αρχίσει η διόγκωση των ραγών) δεν αποτελούν μέρος της καλλιεργητικής πρακτικής στην περιοχή. Μερικές φορές εφαρμόζεται ένας ψεκασμός στο στάδιο της άνθησης για την προστασία των ανθέων αφού την άνοιξη, με ευνοϊκές συνθήκες ο μύκητας εισέρχεται από το στίγμα ή και τα άλλα ανθικά μέρη και προκαλεί μια λανθάνουσα μόλυνση στους άωρους καρπούς, η οποία εξαπλώνεται το φθινόπωρο με την έναρξη ωρίμανσεως και προκαλεί σήψη των ραγών. Δεν υπάρχουν δημοσιευμένες εργασίες για την επίδραση αυτού του ψεκασμού (κατά το στάδιο της άνθησης), στην τελική συγκέντρωση των υπολειμμάτων κατά την ωρίμανση των ραγών. Το πιθανότερο όμως είναι να έχει ελάχιστη έως μηδενική επίδραση, επειδή μειώνεται πολύ η συγκέντρωση των υπολειμμάτων λόγω της αύξησης του όγκου των ραγών, από το σχηματισμό τους μέχρι το τελικό τους μέγεθος κατά το στάδιο της ωρίμανσης, (αραίωση- dilution effect).

Τα δικαρβοξυμιδικά και ιδιαίτερα το iprodione χρησιμοποιούνται ευρύτατα. Οι ψεκασμοί που εφαρμόζονται συνήθως είναι δύο και γίνονται τέλος καλοκαιριού- αρχές φθινοπώρου, μετά την έναρξη της ωρίμανσεως των σταφυλιών, λόγω της προσβολής των ραγών από την ευδεμίδα και της πιθανής δευτερεύουσας προσβολής από το βοτρυτή. Σε περιπτώσεις δυσμενών συνθηκών (προσβολή από ευδεμίδα και υγρός καιρός) εφαρμόζεται και τρίτος ψεκασμός. Στους δύο ή τρεις αυτούς

ψεκασμούς οφείλονται τα υπολείμματα στα σταφύλια κατά τη συγκομιδή. Η δόση εφαρμογής είναι συνήθως 75 γρ. δ.ο. σε 100 lt νερού με τα οποία ψεκάζεται ένα περίπου στρέμμα αμπελώνα. Οι ψεκασμοί γίνονται κατευθυνόμενοι στους βότρυες μέχρι απορροής του ψεκαστικού υγρού, οπότε η έκταση που θα ψεκαστεί με 100 lt εναιωρήματος εξαρτάται από τον όγκο της παραγωγής.

Λόγω της ευρείας εφαρμογής δικαρβοξιμιδικών μυκητοκτόνων στις οινοποιήσιμες ποικιλίες, υπάρχουν ανησυχίες για την πιθανή ύπαρξη υπολειμμάτων τους, τόσο στα σταφύλια όσο και στο κρασί, και οι εργασίες που έχουν γίνει διεθνώς σχετικά με το θέμα αυτό παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να αναλυθεί η συμπεριφορά των υπολειμμάτων του iprodione σε πείραμα αγρού στα σταφύλια για τις εδαφοκλιματικές συνθήκες της περιοχής Νέας Αγχιάλου και τη συνήθη καλλιεργητική πρακτική, καθώς και η τύχη των υπολειμμάτων μετά την οινοποίηση.

Προηγούμενες εργασίες πάνω στο θέμα των υπολειμμάτων δικαρβοξιμιδικών στα σταφύλια αναφέρουν τα παρακάτω αποτελέσματα: Ο Andre, σε πείραμα που έγινε το 1974, βρήκε το μέσο ύψος των υπολειμμάτων του iprodione 1,3 και 2,1 mg/kg με δόσεις εφαρμογής 100 και 160 γρ./στρ. αντίστοιχα (Andre et.al, 1977). Ένας άλλος ερευνητής βρήκε μέγιστα ύψη υπολειμμάτων 4,18 mg/kg για το procymidone, 2,42 mg/kg για το vinclozolin και 5,03 mg/kg για το iprodione. Το πείραμα έγινε με ποικίλες δόσεις εφαρμογής, αριθμό εφαρμογών 1-4 και σε διαστήματα μετά την τελευταία εφαρμογή από 28 έως 61 ημέρες (Brandolini et.al, 1979). Σε πειράματα που έγιναν κατά τα έτη 1978 έως 1980 (Lemperle et.al, 1982), τα υπολείμματα βρέθηκαν να κυμαίνονται μεταξύ 1,7 και 3,8 mg/kg για το procymidone, 0,6 και 1,5 mg/kg για το vinclozolin και 0,7 και 2,0 mg/kg για το iprodione, 28 ημέρες μετά την τελευταία εφαρμογή. Δεδομένα από διάφορες χώρες της Ευρώπης, τη Νέα Ζηλανδία και τη Νότιο Αφρική δείχνουν ότι 14 ημέρες μετά τον τελευταίο ψεκασμό τα υπολείμματα του iprodione κυμαίνονταν μεταξύ 0,6 και 9,3 mg/kg, ενώ μετά από 35-36 ημέρες αυτά ήταν 0,4-5,1 mg/kg (WHO/FAO, 1982). Τέλος, πείραμα που έγινε το 1982 έδωσε τα εξής αποτελέσματα: 0,13-3,78 mg/kg για

το procymidone, 0,23-1,11 mg/kg για το vinclozolin και 1,16-3,13 mg/kg για το iprodione (Flori et.al, 1984).

Σχετικά με το ποσοστό παραμονής των υπολειμμάτων στο κρασί οι εργασίες που έχουν δημοσιευθεί παρουσιάζουν ενδιαφέρον. Ο Cabras (1984) μελέτησε την υποβάθμιση των υπολειμμάτων των vinclozolin, procymidone, iprodione και chlozolate σε λευκό κρασί για συγκεντρώσεις 3,0 mg/kg, σε pH 3,0 και 4,0 και θερμοκρασία 30 °C, και δίνει την σειρά φθίνουσας ταχύτητας υποβάθμισης η οποία είναι: chlozolate>>vinclozolin>procymidone>iprodione. Επίσης αναφέρει ότι το chlozolate υποβαθμίστηκε ταχύτατα, το iprodione παρέμεινε σταθερό και μετά την πάροδο 92 ημερών, ενώ τα vinclozolin και procymidone έδειξαν ενδιάμεση συμπεριφορά. Οι τάσεις παρέμειναν ίδιες και στις δύο τιμές pH. Όμως σε pH 4,0 η ταχύτητα υποβάθμισης ήταν μεγαλύτερη κατά 17-29 % από ότι σε pH 3,0. Το iprodione παρέμεινε σταθερό, γεγονός που οφείλεται στο χαμηλό pH, ενώ σε αλκαλικά διαλύματα βρέθηκε ότι σχηματίζεται το ισομερές I (Cooke et.al., 1979). Από την εργασία των Garcia-Cazorla και Xirau-Vayreda (1994) φαίνεται επίσης ότι αυτό που παραμένει περισσότερο στο κρασί μετά την οиноποίηση είναι το iprodione το οποίο παρουσιάζει ποσοστά μείωσης 28,7 % από τα σταφύλια στο μούστο και 23,6 % από το μούστο στο κρασί. Τα ανάλογα ποσοστά για το procymidone είναι 35,9 % και 66,0 % αντίστοιχα, ενώ για το vinclozolin, 40,5 % και 63,6 %.

Από όλες τις εργασίες που αναφέρθηκαν φαίνεται ότι το iprodione είναι το πιο σταθερό από τα δικαρβοξυμιδικά και αυτό του οποίου τα υπολείμματα παραμένουν περισσότερο στα σταφύλια και τον οίνο μετά την οиноποίηση. Έτσι επιλέχθηκε για το πείραμα αγρού αυτής της εργασίας το iprodione, το οποίο (λόγω της σταθερότητάς του σε συνδυασμό με την ευρεία χρήση του στους αμπελώνες της περιοχής της Ν. Αγχιάλου) πιθανόν να προκαλεί προβλήματα υψηλών συγκεντρώσεων υπολειμμάτων.

Οι μέθοδοι ανάλυσης δικαρβοξυμιδικών στη βιβλιογραφία αναφέρουν τη χρήση είτε υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) είτε αέριας χρωματογραφίας (GC). Τα υπολείμματα του iprodione αναλύονται με τη χρήση ανιχνευτών ECD και NPD. Ο ECD έχει μεγάλη ευαισθησία και χρησιμοποιείται όταν το ύψος των υπολειμμάτων είναι μικρό.

Οι σημαντικότερες μέθοδοι εκχύλισης που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για το κρασί είναι η εκχύλιση υγρού- υγρού και η εκχύλιση στερεάς φάσης. Για την εκχύλιση υγρού- υγρού αναφέρονται ως εκχυλιστικά μέσα το εξάνιο (hexane) (Sala et.al.,1997) και το κυκλοεξάνιο (cyclohexane) (Garcia-Cazorla & Xirau-Vayreda, 1994). Σχετικά με την εκχύλιση στερεάς φάσης αναφέρονται διάφορα προσροφητικά. Η μέθοδος που αναφέρει η Matisova χρησιμοποιεί πορώδη άνθρακα (Matisova et.al.,1996) ενώ ο Holland αναφέρει τη χρήση στηλών C-18 (Holland et.al., 1994). Επίσης αναφέρεται και πλήρως αυτοματοποιημένη εκχύλιση στερεάς φάσης (Kaufman, 1997).

Για την εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εκχύλισης και υγρού- υγρού με εκχυλιστικό μέσο το cyclohexane, τόσο στο κρασί όσο και στα σταφύλια λόγω της απλότητάς της. Η ανάλυση έγινε με σύστημα αέριας χρωματογραφίας και χρήση ανιχνευτή NPD.

2. Υλικά και μέθοδοι

Πειραματικός αγρός

Το πείραμα έγινε σε αμπελώνα της οινοποιήσιμης ποικιλίας Ροδίτης στην περιοχή Νέας Αγχιάλου του Νομού Μαγνησίας από τον Αύγουστο μέχρι τον Οκτώβριο του 1997. Τα πρέμνα, που ήταν φυτευμένα σε γραμμές, απείχαν 1,20 μέτρα επι της γραμμής και 1,80 μέτρα μεταξύ των γραμμών. Ο αμπελώνας χωρίστηκε σε δυο τμήματα (πειραματικούς αγρούς) με 5 πειραματικά τεμάχια των 12 πρέμνων το κάθε ένα. Από τα 5 πειραματικά τεμάχια του κάθε τμήματος τα τέσσερα δέχτηκαν εφαρμογή του iprodione ενώ το πέμπτο παρέμεινε αψέκαστο και χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Στο πρώτο τμήμα του αμπελώνα έγιναν δύο (2) εφαρμογές iprodione και στο δεύτερο τρεις (3). Γύρω από τον αγρό αφέθηκαν τέσσερες γραμμές περιθώριο. Στον αγρό έγιναν όλες οι συνήθειες στην περιοχή καλλιεργητικές φροντίδες. Λόγω έντονης προσβολής στους μάρτυρες από ευδεμίδα και της πιθανότητας να μην υπάρξουν κατά τη συγκομιδή σταφύλια για την ολοκλήρωση του πειράματος, έγιναν επεμβάσεις με το σκεύασμα Bactospane WP (*Bacillus thuringiensis* 16.000 I.U./mg) της εταιρείας ΧΕΛΛΑΦΑΡΜ.

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα Rovral 50%WP το οποίο περιέχει 50% δ.ο. iprodione υπο μορφή βρέξιμης σκόνης. Οι ψεκασμοί έγιναν με υδατικό εναιώρημα του παραπάνω σκευάσματος με δόση 150 gr/100 lt (75 gr/100 lt σε δ.ο.) τις εξής ημερομηνίες: 5 και 26 Αυγούστου 1997, και 5 Αυγούστου, 26 Αυγούστου και 14 Σεπτεμβρίου 1997 στις περιπτώσεις των δύο και τριών ψεκασμών αντίστοιχα. Χρησιμοποιήθηκε χειροκίνητο ψεκαστικό πλάτης. Ο ψεκασμός ήταν κατευθυνόμενος στους βότρυες και έγινε μέχρι απορροής του ψεκαστικού υγρού.

Οι μέσες μέγιστες θερμοκρασίες (AVER max) ήταν 28,4°C, 23,5°C και 21,8°C, ενώ οι μέσες ελάχιστες (AVER min) ήταν 17,4°C, 12,9°C και 10,5°C για τους μήνες Αύγουστο, Σεπτέμβριο και Οκτώβριο αντιστοίχως. Η βροχόπτωση κατά τη διάρκεια του πειράματος ήταν 13,6 mm για τον Αύγουστο, 13,0 mm για τον Σεπτέμβριο και

21,6 mm για τον Οκτώβριο, ενώ η μέση σχετική υγρασία (RH AVER) κυμάνθηκε από 63,5 % τον Αύγουστο μέχρι 74,2 % τον Οκτώβριο.

Δειγματοληψία

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε, σύμφωνα με τις οδηγίες δειγματοληψίας των FAO/WHO όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.2 (Πίνακας 1. σελ. 27), δηλαδή συλλέγοντας διάφορα τμήματα από 12 βότρυες από τέσσερα τουλάχιστον πρέμνα. Το συνολικό βάρος του κάθε δείγματος ήταν τουλάχιστον 1 kg. Πάρθηκαν τμήματα από βότρυες που βρίσκονταν τόσο σε χαμηλή όσο και σε υψηλή θέση στο πρέμνο, και από θέσεις τόσο εκτεθειμένες στο αμέσο ηλιακό φως όσο και από προστατευόμενες από το φύλλωμα.

Δείγματα σταφυλιών συνελέγησαν 21, 28 και 35 ημέρες μετά τον τελευταίο ψεκασμό καθώς και μερικές ώρες μετά τον ψεκασμό, αφού είχε στεγνώσει το ψεκαστικό υγρό (0 ημέρες). Τα συλλεχθέντα δείγματα, αφού απορρίφθηκαν προσβλημένες και αλλοιωμένες ράγες, ομογενοποιήθηκαν με blender. Το ομογενοποιημένο υλικό χωρίστηκε σε αναλυτικά υποδείγματα τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -18°C μέχρι την ανάλυσή τους. Η δειγματοληψία, η μεταφορά στο εργαστήριο, η ομογενοποίηση και η αποθήκευση έγιναν αυθημερόν.

Επίσης, για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων στο κρασί, 28 ημέρες μετά τον τελευταίο ψεκασμό συνελέγησαν 30 βότρυες από κάθε πείραμα οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για οиноποίηση. Τα δείγματα των σταφυλιών αναλύθηκαν μαζί με τα κρασιά.

Χημικά αντιδραστήρια

Οι διαλύτες cyclohexane και acetone που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τύπου pestigrade. Το πρότυπο του iprodione ήταν καθαρότητας 99,7 % , της Rhone Poulenc.

Εκχύλιση και καθαρισμός

Η εκχύλιση έγινε με διαφορετικό τρόπο για τα σταφύλια και το κρασί. Για τα σταφύλια εφαρμόστηκε η μέθοδος που περιγράφουν οι Garcia-Cazorla & Xirau-Vayreda (1994). Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 10 gr ομογενοποιημένου δείγματος μέσα σε κυλινδρικούς σωλήνες και προστέθηκαν 10 ml cyclohexane. Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε παλινδρομικό ανακινητή για 30 min και έπειτα φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στις 3.000 rpm. Μέρος του υπερκείμενου υγρού (άνω φάση- cyclohexane) μεταφέρθηκε σε φιαλίδια για έγχυση στον αεριοχρωματογράφο.

Για τα δείγματα κρασιού εφαρμόστηκε η μέθοδος εκχύλισης, που επίσης περιγράφουν οι Garcia-Cazorla & Xirau-Vayreda (1994), ελαφρώς τροποποιημένη. Ζυγίστηκαν 20 gr κρασιού σε σωλήνες και προστέθηκαν 4 ml cyclohexane. Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε παλινδρομικό ανακινητή για 15 min και έπειτα φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στις 500 rpm. Ένα μέρος από το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε φιαλίδια για έγχυση στον αεριοχρωματογράφο.

Με την παραπάνω μέθοδο εκχύλισης γίνεται ταυτόχρονα και ο καθαρισμός (μέθοδος καθαρισμού με κατανομή υγρού- υγρού, Παράγραφος 2.5.3, σελ. 37).

Χρωματογραφική ανάλυση

Για την ανάλυση του iprodione στα εκχυλίσματα των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριας χρωματογραφίας τύπου Hewlett-Packard 6890 με ανιχνευτή αζώτου φωσφόρου (NPD) και τριχοειδή χρωματογραφική στήλη (30 m X 0,32 mm i.d.) τύπου HP-5. Η καταγραφή και επεξεργασία του χρωματογραφικού σήματος έγινε με σε H.Y. με το πρόγραμμα Chem Station. Οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου ήταν οι εξής:

- εκχυτής δείγματος 'on column' (in track oven mode),
- όγκος έγχυσης δείγματος 2μl,
- ανιχνευτής 300°C,
- φέρον αέριο ήλιο, με ροή 2,0 ml/min,
- αρχική θερμοκρασία φούρνου 70°C (διατήρησή της για 0,2 min),

- αύξηση με ρυθμό $14^{\circ}\text{C}/\text{min}$ μέχρι τους 200°C ,
- αύξηση με ρυθμό $7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ μέχρι τους 250°C και
- αύξηση με ρυθμό $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ μέχρι τους 280°C .

Η ανάλυση διαρκεί 18 min και ο χρόνος κατακράτησης για το iprodione κάτω από τις παραπάνω συνθήκες είναι 15,5 min.

Ο προσδιορισμός των υπολειμμάτων έγινε με τη χρήση της μεθόδου του εξωτερικού προτύπου. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την καμπύλη αναφοράς έγιναν με κατάλληλες αραιώσεις από το μητρικό διάλυμα. Το μητρικό διάλυμα έγινε με διάλυση κατάλληλης ποσότητας στερεάς πρότυπης ουσίας (ζυγισμένης με ακρίβεια) σε acetone και είχε συγκέντρωση 1.000 mg/l.

Υπολογισμοί

Υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις (SD) των ανακτήσεων από φορτισμένα δείγματα σε τρία επίπεδα φόρτισης 1, 2,5 και 5 mg/kg, και, οι μέσοι όροι, οι τυπικές αποκλίσεις και οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD) από τα αποτελέσματα των αναλύσεων των σταφυλιών και των οίνων. Επίσης υπολογίστηκαν τα ποσοστά μείωσης των συγκεντρώσεων των υπολειμμάτων στα σταφύλια σε σχέση με το χρονικό διάστημα από τον τελευταίο ψεκασμό καθώς και τα ποσοστά μείωσης από τα σταφύλια στον οίνο.

3. Αποτελέσματα

Οι ανακτήσεις του iprodione που έγιναν από φορτισμένα δείγματα σταφυλιών και κρασιού σε τρία επίπεδα, 1, 2,5 και 5 mg/kg, παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1.: Ανακτήσεις του iprodione από φορτισμένα δείγματα σταφυλιών και οίνου.

Επίπεδο φόρτισης (mg/kg)	Ανάκτηση % \pm SD	
	Σταφύλια	Οίνος
1	89,7 \pm 3,8	95,1 \pm 4,8
2,5	88,4 \pm 4,2	96,8 \pm 2,8
5	86,2 \pm 5,2	98,2 \pm 3,1

Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από τρεις επαναλήψεις. SD : τυπική απόκλιση

Οι μέσες τιμές των υπολειμμάτων του iprodione στα σταφύλια τα οποία δέχτηκαν δύο ψεκασμούς με το μυκητοκτόνο Rovral βρέθηκαν στα επίπεδα των 3,6 mg/kg αμέσως μετά τον ψεκασμό (0 ημέρες), 3,1 mg/kg σε 21 ημέρες και 2,7 mg/kg σε 28 ημέρες, και παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2.: Υπολείμματα iprodione σε διάφορες ημερομηνίες μετά τον τελευταίο ψεκασμό στα σταφύλια τα οποία δέχτηκαν δύο ψεκασμούς με το μυκητοκτόνο Rovral.

Ημέρες μετά τον τελευταίο ψεκασμό	Υπολείμματα iprodione στα σταφύλια τα οποία δέχτηκαν δύο ψεκασμούς	
	mg/kg \pm SD	RSD
0	3,6 \pm 0,93	26%
21	3,1 \pm 0,46	14,8%
28	2,7 \pm 0,30	11%

Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από τέσσερες αναλύσεις. SD : τυπική απόκλιση,
RSD : σχετική τυπική απόκλιση ή συντελεστής παραλλακτικότητας

Από τον Πίνακα 2. προκύπτει ότι το ποσοστό μείωσης των υπολειμμάτων από την ημέρα του τελευταίου ψεκασμού (ημέρα 0) μέχρι την 21^η από αυτόν είναι 14 %, και από την ημέρα 0 μέχρι την 28^η, το ποσοστό μείωσης είναι 25 %.

Στην περίπτωση που έγιναν τρεις ψεκασμοί οι μέσες τιμές των υπολειμμάτων του iprodione στα σταφύλια βρέθηκαν στα επίπεδα των 5,0 mg/kg αμέσως μετά τον ψεκασμό (0 ημέρες), 4,3 mg/kg σε 21 ημέρες, 4,2 mg/kg σε 28 ημέρες και 4,0 mg/kg σε 35 ημέρες, και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3.: Υπολείμματα iprodione σε διάφορες ημερομηνίες μετά τον τελευταίο ψεκασμό στα σταφύλια τα οποία δέχτηκαν τρεις ψεκασμούς με το μυκητοκτόνο Rovral.

Ημέρες μετά τον τελευταίο ψεκασμό	Υπολείμματα iprodione στα σταφύλια τα οποία δέχτηκαν τρεις ψεκασμούς	
	mg/kg \pm SD	RSD
0	5,0 \pm 0,69	13,8%
21	4,3 \pm 0,59	13,7%
28	4,2 \pm 0,59	14%
35	4,0 \pm 0,43	10,8%

Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από τέσσερες αναλύσεις. SD : τυπική απόκλιση, RSD : σχετική τυπική απόκλιση ή συντελεστής παραλλακτικότητας

Από τον Πίνακα 3. προκύπτει ότι το ποσοστό μείωσης των υπολειμμάτων από την ημέρα του τελευταίου ψεκασμού (ημέρα 0) μέχρι την 21^η από αυτόν είναι 14 %, από την ημέρα 0 μέχρι την 28^η το ποσοστό μείωσης είναι 16 %, ενώ μέχρι την 35^η φτάνει στο 20 %.

Τα υπολείμματα στον οίνο που προήλθε από σταφύλια τα οποία δεχτηκαν δύο ψεκασμούς βρέθηκαν στα επίπεδα των 1,8 mg/kg και σε αυτόν που προήλθε από σταφύλια τα οποία δεχτηκαν τρεις ψεκασμούς, στα επίπεδα των 2,6 mg/kg και παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

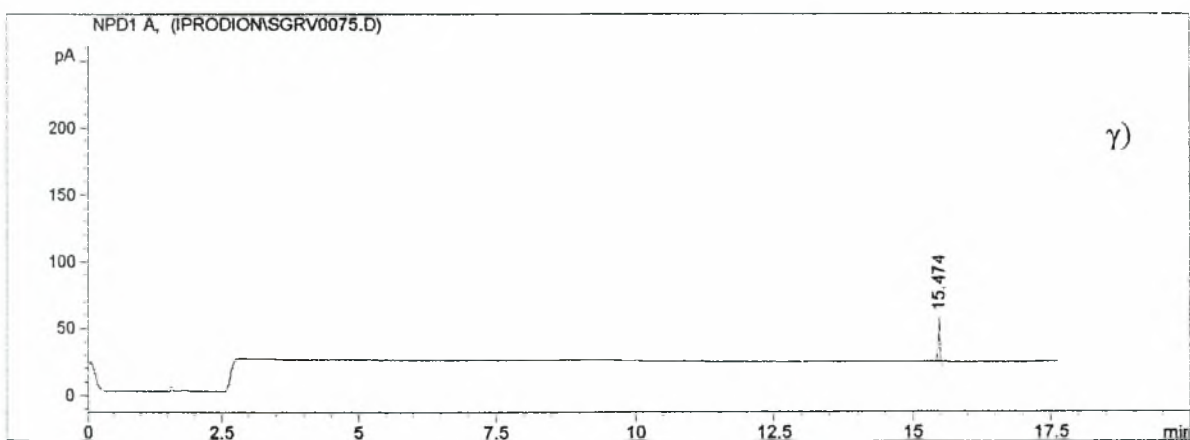
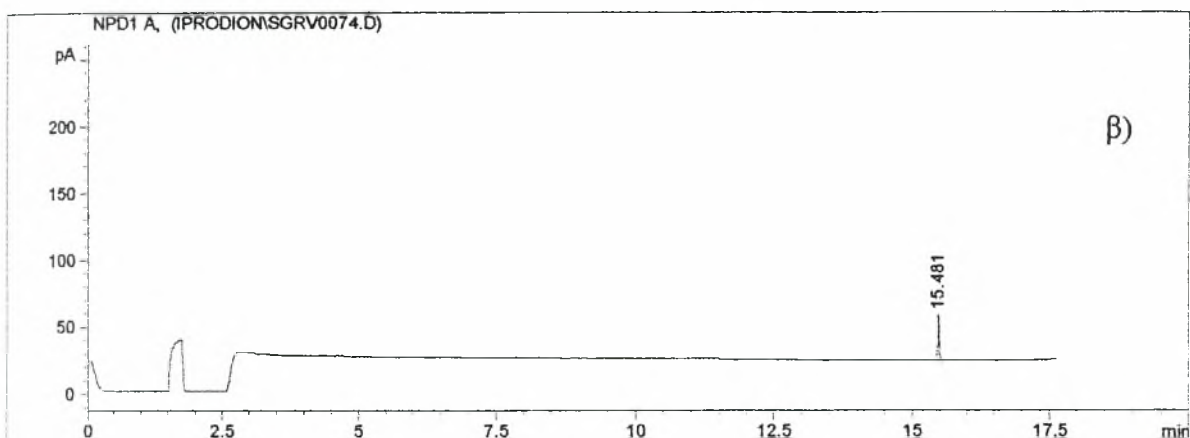
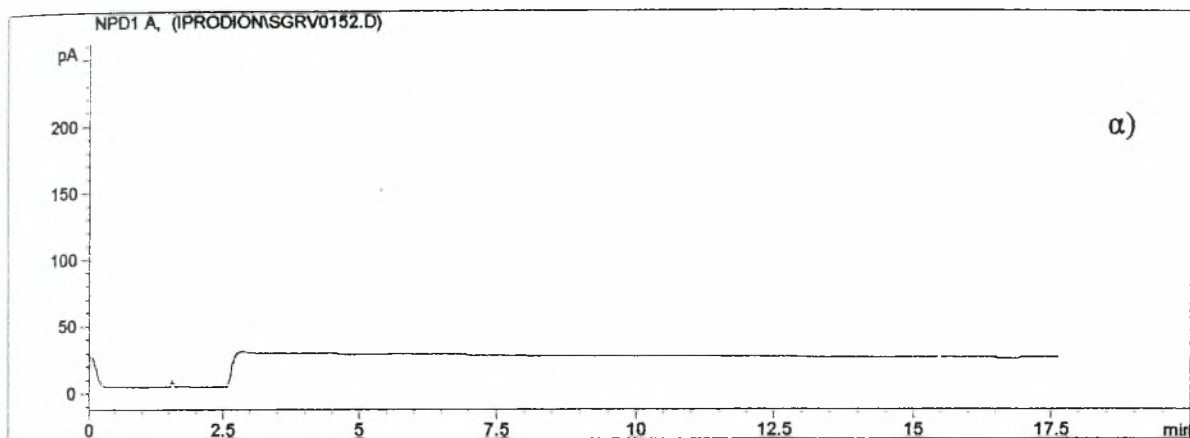
Πίνακας 4.: Υπολείμματα iprodione στον οίνο που προήλθε από σταφύλια τα οποία δέχτηκαν δύο και τρεις ψεκασμούς με το μυκητοκτόνο Rovral.

Υπολείμματα iprodione στον οίνο που προήλθε από σταφύλια τα οποία δέχτηκαν δύο ψεκασμούς mg/kg \pm RSD	Υπολείμματα iprodione στον οίνο που προήλθε από σταφύλια τα οποία δέχτηκαν τρεις ψεκασμούς mg/kg \pm RSD
1,8 \pm 2,8%	2,6 \pm 2,1%

Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από τέσσερες χρωματογραφικές αναλύσεις.

RSD : σχετική τυπική απόκλιση ή συντελεστής παραλλακτικότητας

Ακολουθούν οι Εικόνες 1. και 2. Στην Εικόνα 1. παρουσιάζονται χρωματογραφήματα προσδιορισμού iprodione σε αψέκαστα σταφύλια (μάρτυρας), δείγμα ψεκασμένων σταφυλιών, και προτύπου διαλύματος iprodione (4 ng). Στην Εικόνα 2. παρουσιάζονται χρωματογραφήματα προσδιορισμού iprodione σε οίνο προερχόμενο από αψέκαστα σταφύλια (μάρτυρας), σε οίνο προερχόμενο από ψεκασμένα σταφύλια, και προτύπου διαλύματος iprodione (20 ng).

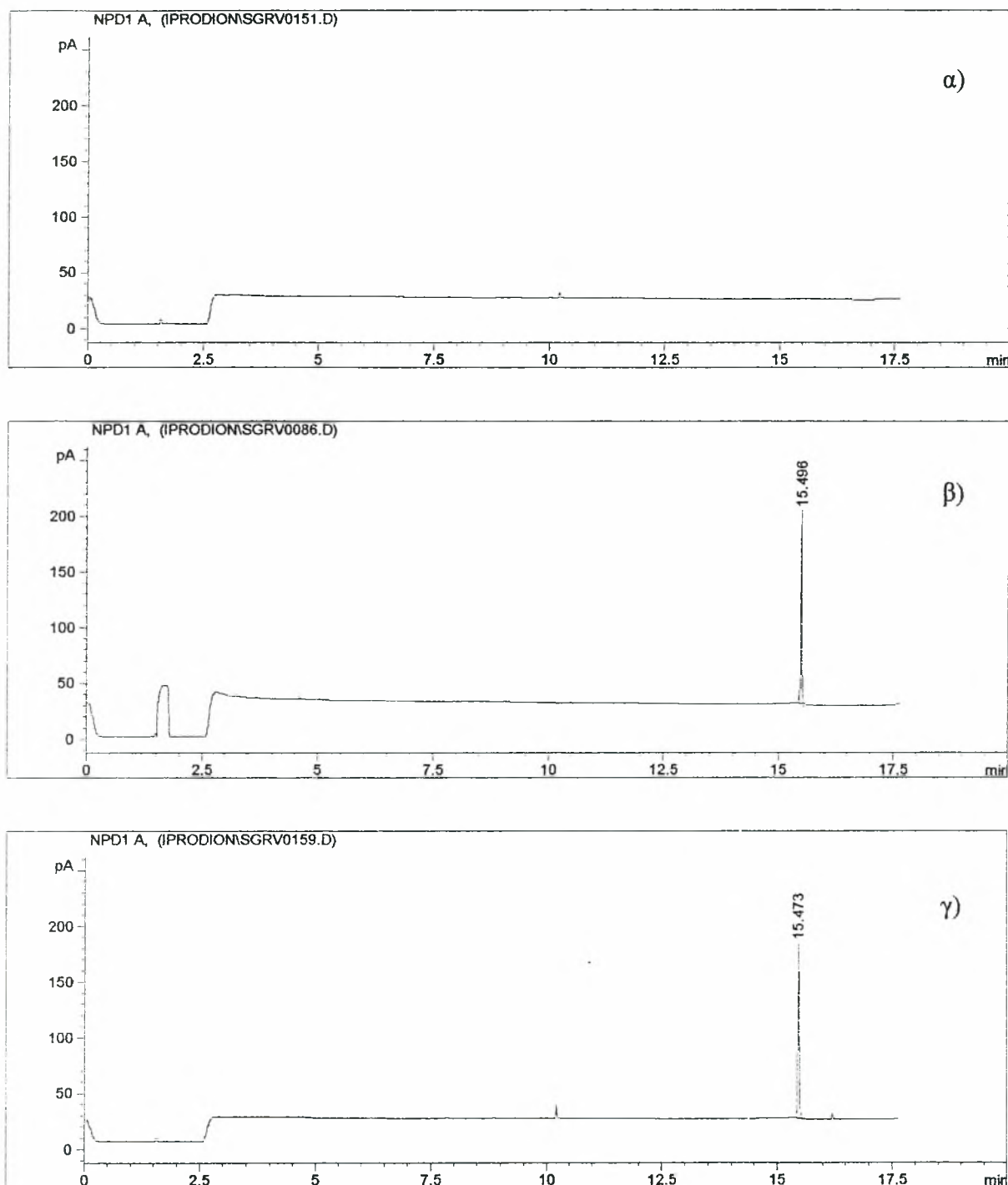


Εικόνα 1.: Χρωματογραφήματα:

α) προσδιορισμού iprodione σε αψέκαστα σταφύλια (μάρτυρας),

β) προτύπου διαλύματος iprodione (4 ng),

γ) προσδιορισμού iprodione σε δείγμα ψεκασμένων σταφυλιών.



Εικόνα 2.: Χρωματογραφήματα:

- α) προσδιορισμού iprodione σε οίνο προερχόμενο από απέκαστα σταφύλια (μάρτυρας),
- β) προτύπου διαλύματος iprodione (20 ng),
- γ) προσδιορισμού iprodione σε οίνο προερχόμενο από ψεκασμένα σταφύλια.

4. Συζήτηση- Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία τα αποτελέσματα των ανακτήσεων του iprodione από τα φορτισμένα δείγματα ήταν ικανοποιητικά. Οι ανακτήσεις στην περίπτωση των σταφυλιών ήταν μεταξύ 86 και 90 %, και στην περίπτωση των οίνων 95 με 98 %. Οι τιμές αυτές βρίσκονται μέσα στο αποδεκτό εύρος για αναλύσεις προσδιορισμού υπολειμμάτων το οποίο είναι 70- 110 % (Council Directive 94/43/EC, Greve, 1984).

Οι συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων στα σταφύλια βρέθηκαν σημαντικά κάτω από το μέγιστο επιτρεπτό όριο των κρατών-μελών της Ευρωπαϊκής Ένωσης το οποίο είναι 10 mg/kg, ενώ οι συντελεστές παραλλακτικότητας (ή σχετικές τυπικές αποκλίσεις, RSD) ήταν από 10,8 έως 26 % με τις περισσότερες τιμές μεταξύ 11 και 14 %. Το MRL 10 mg/kg είναι το μέγιστο επιτρεπτό όριο υπολειμμάτων για τα επιτραπέζια σταφύλια και ισχύει και για τα οινοποιήσιμα. Συγκεκριμένα, 28 ημέρες μετά τον τελευταίο ψεκασμό τα υπολείμματα του iprodione στα σταφύλια τα οποία δέχτηκαν δύο ψεκασμούς βρέθηκαν στα επίπεδα των 2,7 mg/kg ενώ σε αυτά τα οποία δέχτηκαν τρεις ψεκασμούς τα υπολείμματα ήταν στα επίπεδα των 4,2 mg/kg. Οι συγκεντρώσεις αυτές είναι σημαντικά μεγαλύτερες από αυτές που αναφέρει ο Andre ο οποίος βρήκε τη μέση συγκέντρωση των υπολειμμάτων του iprodione 1,3 και 2,1 mg/kg με δόσεις εφαρμογής 100 και 160 γρ./στρ.αντίστοιχα, δηλαδή δόσεις μεγαλύτερες από από αυτές που εφαρμόστηκαν στην παρούσα εργασία (Andre et.al., 1977). Σε πειράματα που έγιναν κατά τα έτη 1978 έως 1980 (Lemperle et.al, 1982) τα υπολείμματα του iprodione 28 ημέρες μετά την τελευταία εφαρμογή βρέθηκαν να κυμαίνονται μεταξύ 0,7 και 2,0 mg/kg. Ένας άλλος ερευνητής βρήκε μέγιστη συγκέντρωση 5,03 mg/kg, (μεγαλύτερη δηλαδή από τις μέσες τιμές 2,7 και 4,2 mg/kg αυτής της εργασίας) (Brandolini et.al, 1979). Το πείραμα έγινε με ποικίλες δόσεις εφαρμογής, αριθμό εφαρμογών 1-4 και σε διαστήματα μετά την τελευταία εφαρμογή από 28 έως 61 ημέρες. Πολύ μικρότερη μέση συγκέντρωση υπολειμμάτων του iprodione αναφέρουν και οι Garcia-Cazorla και Xirau-Vayreda (1994).

Οι παραπάνω ερευνητές, για τρεις ψεκασμούς με 75 γρ./100 lt και σε 30 ημέρες μετά τον τελευταίο ψεκασμό αναφέρουν μέση συγκέντρωση στα σταφύλια 1,01 mg/kg.

Από τον Πίνακα 2. (παράγραφος 3. σελ. 57) με τα αποτελέσματα για διάφορες ημερομηνίες, προκύπτει ότι το ποσοστό μείωσης των υπολειμμάτων από την ημέρα του τελευταίου ψεκασμού (ημέρα 0) μέχρι την 21^η από αυτόν είναι 14 %, και από την ημέρα 0 μέχρι την 28^η, το ποσοστό μείωσης είναι 25 %. Από τον Πίνακα 3. της ίδιας παραγράφου, προκύπτει ότι το ποσοστό μείωσης των υπολειμμάτων από την ημέρα του τελευταίου ψεκασμού (ημέρα 0) μέχρι την 21^η από αυτόν είναι 14 %, από την ημέρα 0 μέχρι την 28^η το ποσοστό μείωσης είναι 16 %, ενώ μέχρι την 35^η φτάνει στο 20 %. Δεν παρατηρήθηκε δηλαδή μεγάλη μείωση των συγκεντρώσεων των υπολειμμάτων όπως έδειξαν και προηγούμενες εργασίες. Αυτό αποδίδεται στο ότι η αποικοδόμηση του iprodione (χημική, φωτοχημική) είναι σχετικά μικρή, ενώ πολύ μικρή είναι και η μείωση της συγκέντρωσης λόγω αύξησης του όγκου των ραγών (αραίωση- dilution effect) αφού οι ψεκασμοί γίνονται την περίοδο που οι ράγες έχουν αποκτήσει σχεδόν το τελικό τους μέγεθος.

Για τους οίνους δεν έχει θεσπιστεί μέγιστο επιτρεπτό όριο υπολειμμάτων, (για τα οиноποιήσιμα σταφύλια ισχύει αυτό που ισχύει για τα επιτραπέζια, 10 mg/kg, όπως προαναφέρθηκε) (OIV, 1994). Οι συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων και στην περίπτωση των οίνων βρέθηκαν χαμηλές. Στην περίπτωση το οίνου που προήλθε από σταφύλια τα οποία δέχτηκαν δύο ψεκασμούς τα υπολείμματα ήταν στα επίπεδα των 1,8 mg/kg ενώ στην περίπτωση που τα σταφύλια είχαν δεχτεί τρεις ψεκασμούς η μέση συγκέντρωση των υπολειμμάτων ήταν 2,6 mg/kg. Οι αρχικές συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων στα σταφύλια ήταν 2,7 και 4,2 mg/kg αντιστοίχως. Παρατηρήθηκε δηλαδή από τα σταφύλια στον οίνο μείωση των συγκεντρώσεων των υπολειμμάτων της τάξης του 33 - 38 %. Σε ανάλογη εργασία οι Garcia-Cazorla και Xirau-Vayreda (1994) αναφέρουν μέση συγκέντρωση υπολειμμάτων στον οίνο 0,55 mg/kg και ποσοστό μείωσης 45 % (1,01 mg/kg μέση συγκέντρωση στα σταφύλια). Οι ίδιοι ερευνητές δίνουν ένα ποσοστό 28,7 % μείωσης των υπολειμμάτων από τα σταφύλια στο κρασί το οποίο οφείλεται στο ότι μέρος των υπολειμμάτων παραμένει στο φλοιό ενώ τα υπόλοιπα βρίσκονται στο χυμό των σταφυλιών (μούστο). Επίσης δίνουν ένα

23,6 % μείωση από το μούστο στον οίνο το οποίο μπορεί να αποδοθεί στις χημικές και βιοχημικές διαδικασίες της οινοποίησης (Garcia-Cazorla & Xirau-Vayreda 1994). Το ποσοστό μείωσης από τα σταφύλια στον οίνο που υπολογίστηκε από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας (33 - 38 %) περιλαμβάνει και τις δύο παραπάνω αιτίες μείωσης. Το ποσοστό αυτό είναι σχετικά μικρό και το αποτέλεσμα είναι σύμφωνο με την εργασία του Cabras (1984). Επίσης λόγω του χαμηλού pH των οίνων ο ταχύς μετασχηματισμός του *iprodione* στο ισομερές I που αναφέρει ο Cooke, δεν παρατηρήθηκε (Cooke et.al., 1979).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι δεν υπάρχουν λόγοι ανησυχίας για την ύπαρξη υψηλών συγκεντρώσεων υπολειμμάτων στα σταφύλια και τον οίνο που παράγεται από αυτά, ακόμα και στην δυσμενή περίπτωση όπου γίνονται τρεις εφαρμογές του φυτοφαρμάκου, εφόσον ακολουθούνται οι οδηγίες χρήσης και τηρείται το διάστημα μεταξύ τελευταίας εφαρμογής και συγκομιδής.

Βιβλιογραφία

Ambrus, A., 1984a. Preparation of Analytical Samples. In: Pesticide Residue Analysis. Ambrus, A., Greenhalgh, R., Eds. Proceedings of a joint FAO/WHO course, Rome. 45-62.

Ambrus, A., 1984b. Sampling for Determination of Pesticide Residues. In: Pesticide Residue Analysis. Ambrus, A., Greenhalgh, R., Eds. Proceedings of a joint FAO/WHO course, Rome. 9-44.

Ames, B. N., 1992. Pollution, Pesticides, and Cancer. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 75 (1), 1-5.

Andre, L., Duval, E. & Hascoet, M., 1977. Residue de pesticides sur le raisins. I.I.F. Commision C2- O.I.V. Commision I-III, Paris. 75-80.

Brandolini, V., Flori, P. & Muscary, P., 1979. Residui di antibiotritici sull' uva e el vino, esperienze condotte in Emilia Romagna. Vitivinocultura 11, 29-32.

Γεωργόπουλος, Σ. Γ. και Ζιώγας, Β. Ν., 1992. Αρχές και Μέθοδοι Καταπολέμησης των Ασθενειών των Φυτών, Εκδ. Β. Ζιώγας, Αθήνα. 236 σελ.

Cabras, P., Meloni, M. and Pirisi, F.M., 1987. Pesticide fate from vine to wine. Rev. Envir. Contam. Toxic. 99, 83-117.

Cabras, P., Meloni, M., Pirisi, F. M. & Pirisi, R., 1984. Degradation of Dicarboximide Fungicides in Wine. Pestic. Sci. 15, 247-252.

Cappelini, R. A., Ceponis, M. J., & Lightner, G. W., 1986. Plant Dis. 70, 1075-1079.

Codex Alimentarius Commission, 1981. Report of the Thirteenth Session of the Codex Committee on Pesticide Residues, Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Cooke, B. K., Loeffler, R. S. T. and Pappas, A. C. 1979. The Structural Rearrangement of Iprodione in Ethanolic Solution. Pestic. Sci. 10, 393-398.

Council Directive 94/43/EC. Off. J. Eur. Com. L227 (1994), 31-55.

Council of Europe, 1995. Guidelines for the protection of ground water.

Επιτροπή Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, 1988. Ταξιδεύοντας στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα, Υπηρεσία Επίσημων Εκδόσεων των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, ΕΚΑΧ-ΕΟΚ-ΕΚΑΕ, Βρυξέλλες-Λουξεμβούργο. 60 σελ.

FAO, 1976. JMPR Evaluations. Rome.

FAO, 1977. JMPR Evaluations. Rome.

FAO, 1979. JMPR Evaluations. Rome.

FAO, 1981. Guidelines on pesticide residue trials to provide data for the registration of pesticides and the establishment of maximum residue limits. Plant protection bulletin, 29.

FAO, 1982. JMPR Evaluations. Rome.

FAO, 1983. JMPR Evaluations. Rome.

FAO, 1985. JMPR Evaluations. Rome.

FAO, 1986. JMPR Evaluations. Rome.

FAO, 1994. JMPR Evaluations. Rome.

FAO/WHO, 1979. 1978 evaluation of some pesticide residues in food. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

FAO/WHO, 1980. 1979 evaluation of some pesticide residues in food. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

FAO/WHO, 1986. Recommended method of sampling for the determination of pesticide residues. Codex Alimentarius Commission of the Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Food and Agriculture Organization/ World Health Organization, VIII, 2nd ed., part VI, Rome.

Flori, P., Manucelli, G., Contarelli, G. & Zironi, R., 1984. Residui antibotritici dicarbossimidici in uve, mosti e vini diverse cultivar e provenienza. *Atti Giornale Fitopatologiche* 2, 41-50.

Freshe, H., 1975. Problems and aspects of present-day residue analysis. *Pesticide Chemistry* 3, IUPAC.

Garcia-Cazorla, J. and Xirau-Vayreda, M. 1994. Persistence of Dicarboximidic Fungicide Residues in Grapes, Must, and Wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 45 (3), 338-340.

Geisman, J.R., 1975. Reduction of pesticide residues in food crops by processing. *Res. Rev.* 54, 43-54.

Genari, M., Negre, M., Gebri, V., Raimondo, E., Minati, J.L., and Gandini, A., 1992. Chlozolinate fate during vinification process. *J. Agric. Food Chem.* 40, 898-900.

Georgacakis, E. and Khan, M., 1971. Toxicity of photoisomers of cyclodiene insecticides to freshwater animals. *Nature*, 223, 120.

Greve, P. A., 1984. Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis. In: *Pesticide Residue Analysis*. Ambrus, A., Greenhalgh, R., Eds. Proceedings of a joint FAO/WHO course, Rome. 281-303.

Holland, P.T., Donald, E. and Malcolm, C.P., 1994. Multiresidue analysis of Pesticides in Wines by Solid-phase Extration. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 77, (1), 79-85.

<http://greenpeace.org/~comms/cod/cod.html>

International Trade Center UNCTAD/GATT, 1987. Tropical and Off-season Fresh Fruits and Vegetables, Geneva, XV, 264.

Kaufman, A., 1997. Fully Automated Determination of Pesticides Wine. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 80, (6), 1302-1307.

Klein, A. W., Goediche, J., Klein, W. Herrchen, M. and Kordel, W., 1993. Environmental assessment of pesticides under directive 91/414/EEC, *Chemosphere*, 26 (5), 979-1001.

Λέντζα-Ρίζου, X., 1983. Η ποιότητα των τροφίμων και τα υπολείμματα των γεωργικών φαρμάκων. *Τα Αγροτικά*, Σεπτέμβριος 1983, 55.

Λέντζα-Ρίζου, X., 1994. Υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων στα αγροτικά προϊόντα. Ρυθμίσεις στην Ευρωπαϊκή Ένωση για την προστασία καταναλωτών και την διευκόλυνση των εμπορικών συναλλαγών. Έκδοση της συγγραφέως, Αθήνα. 67 σελ.

Λέντζα-Ρίζου, Χ., 1997α. Γεωργική Φαρμακολογία, Διδακτικές σημειώσεις, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής και Ζωϊκής Παραγωγής, Βόλος. 407 σελ.

Λέντζα-Ρίζου, Χ., 1997β. Επίδραση των μεταποιητικών διαδικασιών στα υπολείμματα των φαρμάκων στα φυτικά προϊόντα. Γεωτεχνικά Επιστημονικά Θέματα, 8 (2), 83-93.

Λέντζα-Ρίζου, Χ., 1997γ. Έρευνα στην Ευρωπαϊκή Ένωση για υπολείμματα φυτοφαρμάκων. Γεωτεχνική Ενημέρωση, 94, Φεβρουάριος 1997, 62-63.

Λιαπής, Κ. Σ., 1997. Γεωργικά φάρμακα και υπολείμματα μετά τη χρήση τους, οικολογική απειλή ή οικολογική υπερβολή. Εργαστήριο υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων, Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Εκάλης 7, 145 61, Κηφισιά.

Lemperle, E., Emmanouilidis, N. & Kerner, E., 1982. Das abbauverhalten der fungizide Ronilan, Rovral und Sumislex auf weintrauben. Deut Lebens Runds 7, 51-55.

Liapis, K. S., Miliadis, G. E. and Aplada-Sarlis, P., 1994. Persistence of monocrotophos residues in greenhouse tomatoes. Bull. Environ, Contam. Toxicol., 53, 303-308.

Liapis, K. S., Miliadis, G. E. and Aplada-Sarlis, P., 1995. Dicofol residues on field sprayed apricots and in apricot juice. Bull. Environ, Contam. Toxicol., 54, 579-583.

Lykken, L., 1963. Important considerations in collecting and preparing crop samples for residue analysis, Res. Rev., 3, 19.

Μηλιάδης, Γ. Ε., 1997. Παράγοντες που επηρεάζουν την τύχη των γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον. Τεχνικό δελτίο αρ. 12, Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Εκάλης 7, 145 61, Κηφισιά. 26 σελ.

Μπαλαγιάννης, Π. Γ., 1985. Μαθήματα Γεωργικής Φαρμακολογίας, Σημειώσεις Γ.Π.Α., Αθήνα. 259 σελ.

Μπαλαγιάννης, Π. Γ., 1994, Εγχειρίδιο Γεωργικών Φαρμάκων, Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα-Πειραιάς. 475 σελ.

MAFF, 1994. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Annual report of the working party on pesticide residues. UK.

Marois, J., Bledsoe, A. M., Gubler, W. D., & Luvisi, D. A., 1986. Plant Dis. 70, 1050-1052.

Matisova, E., Kakalikova, L., Lesko, J. and Zeeup, J., 1996. Application of porous carbon for solid-phase extraction of dicarboximide fungicide residues from wines in combination with high-resolution capillary gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 754, 445-454.

Molinari, GP., Del Re, A., Corti, G., Trevisan, M. & Begamaschi, E., 1981. Determinazione di residui antiparassitari in uve e mosti. La difesa delle piante 3, 135-142.

OIV, 1994. Residus de Pesticides, Limites autorisees. Office International de la Vigne et du Vin, Paris.

Παναγόπουλος, Χ. Γ., 1993. Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων και Αμπέλου, Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα. 463 σελ.

Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, Ε., 1991α. Γεωργικά Φάρμακα- Διδακτικές Σημειώσεις, μέρος Ι, Έκδοση Υπηρεσίας Δημοσιευμάτων Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη. 121 σελ.

Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, Ε., 1991β. Γεωργικά Φάρμακα- Διδακτικές Σημειώσεις, μέρος II, Έκδοση Υπηρεσίας Δημοσιευμάτων Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη. 183 σελ.

Pappas, A. C., Cooke, K. B. and Jordan, W. L., 1979. Insensitivity of *Botrytis cinerea* to iprodione, procymidone and vinclozolin, and their uptake by the fungus. Pl. Path. 28, 71-76.

Papadopoulou-Mourkidou, E., 1991. Postharvest- Applied Agrochemicals and Their Residues in Fresh Fruits and Vegetables, J. Assoc. Off Anal. Chem. 74 (5), 745-765.

Σταύρακας, Δ. Ε., 1997α. Μαθήματα Γενικής Αμπελουργίας, Διδακτικές σημειώσεις, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής και Ζωϊκής Παραγωγής, Βόλος. 444 σελ.

Σταύρακας, Δ. Ε., 1997β. Μαθήματα Αμπελογραφίας, Διδακτικές σημειώσεις, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής και Ζωϊκής Παραγωγής, Βόλος. 276 σελ.

Sala, C., Busto, O. and Guasch, J., 1997. Quick Gas Chromatographic Method for Determining Common Pesticides in Must and Wines. Chromatographia, 44, (5/6), 320-324.

Scrano, L., Faretra, F., Cariddi, C., Antonacci, E. and Bufo, S. A., 1991. Evaluation of Dicarboximide Residues in Cold-Stored Grapes Exposed to Field and Post-harvest Treatments. Pestic. Sci. 31, 37-44.

Τσιτσιπής, Ι. Α., 1997. Εφαρμοσμένη Εντομολογία, Διδακτικές σημειώσεις, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής και Ζωϊκής παραγωγής, Βόλος.

The Pesticide Manual, 1994. British Crop Protection Council and Royal Society of Chemistry, 10th ed., BCPC and RSC, London, UK. 1340.

Vettorazzi, G., 1976. State of art of the toxicological evaluation carried out by the joint FAO/WHO, meeting on pesticide residues. II. Carbamate and organophosphorus pesticides used in agriculture and public health. *Residue Rev.*, 63, 1-44.

Visi. E., 1984. Methods of Extraction. In: *Pesticide Residue Analysis*. Ambrus, A., Greenhalgh, R., Eds. Proceedings of a joint FAO/WHO course, Rome. 63-68.

Wheeler, W. B., Thomson, N. P., Edecstein, R. L. and Krause, R.T., 1981. Degradation of methomyl residues in frozen strawberries. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64, 1211-1215.

WHO/FAO, 1982. *Pesticide residues in food, 1981 evaluations*, 461.

